

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Democratic and Popular Republic of Algeria

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ministry of Higher Education and Scientific Research

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة

École Nationale Supérieure Vétérinaire Rabie Bouchama.

Higher National Veterinary School Rabie Bouchama.



N° d'ordre : 02/Doc.Science/2024

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat en Sciences**

Ecole Doctorale

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Vétérinaires

Spécialité :

« **Production, hygiène et santé animale : Sciences agrovétérinaires** »

THÈME

Etude de l'innocuité et des propriétés médicinales de *Solenostemma argel* et ses applications possibles en médecine vétérinaire

Présenté par : BENMAAROUF Daouia Keltoum

Soutenu publiquement, le 14/03/2024 devant le jury :

AZZAG Nawel	Pr (ENSV)	Présidente
BEN-MAHDI Meriem Hind	Pr (ENSV)	Directrice de thèse
KOURICHI OUAR Mounira	Pr (Faculté de Médecine, Alger 1)	Examinatrice
BOUDIS Hakim	Pr (Faculté de Médecine, Alger 1)	Examineur
BESSEKHOUAD Yassine	Pr (ENSV)	Examineur
CHIKHOUNE Anis	MCA (ESSAIA)	Examineur
CHINA Bernard	Dr PhD (Sciensano, Belgique)	Membre invité
BENDISARI Kheira	Pr (Faculté de Médecine, Alger 1)	Membre invité

Année Université 2023/2024

Abstract

Solenostemma argel is a tropical plant growing in the Algerian desert used traditionally for the treatment of several illnesses. The aim of this study is to prove the safety and the antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antinociceptive, wound healing, anti-ulcer and antidiabetic effects of *S. argel* acetonic (ACSA), methanolic (MESA) and aqueous (AQSA) extracts and those of its essential oil (EOSA).

ACSA, MESA and AQSA profiles were established by UHPLC/DAD/ESI-MS² and EOSA profil was carried out by GC-MS and NMR. LCMS analysis allowed the identification of 16 components for ACSA and 28 components for each of MESA and AQSA. Using GC-MS, twenty components were characterized in EOSA including linalool (57.10%), terpineol (12.95%), trans-geraniol (12.65%) and nerol (4.67%). The main compound linalool was isolated by NMR. The toxicity of products was evaluated by an acute toxicity test and a skin toxicity test. Antioxidant activity of ACSA, MESA and AQSA was performed by DPPH radical scavenging assay. Extracts expressed a maximum radical scavenging activity with a IC₅₀ value between 17,33 to 36,05 µg/ml. Antimicrobial activity was tested by agar diffusion and microdilutions methods for MIC and MBC. EOSA and linalool exhibited significant antibacterial activity against all the tested bacteria. Anti-inflammatory effects of EOSA, ACSA, MESA and AQSA were determined in three animal models: carrageenan-induced paw oedema in rats, xylene-induced ear oedema and cotton pellet-induced granuloma formation in rats. Extracts and EOSA at 250 and 400 mg/kg significantly reduced carrageenan induced paw oedema with rates ranging from 63,31% to 89,83% 6h after carrageenan injection. Extract and EOSA also produced significant dose-dependent anti-inflammatory effect against xylene-induced ear oedema and cotton pellets-induced granuloma formation in rats. Further, anti-nociceptives activities of extracts and EOSA were assessed by hot plate test, acetic acid-induced abdominal writhing test and formalin test. Extracts and EOSA at 250 and 400 mg/kg significantly reduced acetic acid-induced writhing with rates ranging from 56,83% to 92,41%. Oral administration of 250 and 400 mg/kg of extracts and EOSA caused a significant dose dependent anti-nociceptive effect in both neurogenic and inflammatory phases of formalin-induced licking. Extracts and EOSA also impacted the pain latency in the hot plat test. The percentage of wound contraction was monitored in an excision model in rats. In the excision rat model, from day 2 to day 10, the wound contraction was significantly higher ($p < 0.05$) for extracts and EOSO treated wound than for the non-treated wound. For the ulcer study, two assays were performed in rats: the aspirin-induced gastric ulcer and the pyloric ligation-induced gastric ulcer. In both ulcer test, the ulcer index is significantly ($p < 0.05$) reduced in extracts and EOSO-treated rats compared to the non-treated rats. The antidiabetic activity of the extracts was carried out according to the model of diabetes induced by alloxane in rats. Extracts caused very significant hypoglycaemic and hypolipidemic effects compared to the control. Moreover, AQSA expressed a very interesting neuroprotective effect.

The present study demonstrated the antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory, antinociceptive, wound healing, anti-ulcer and antidiabetic effects of *S. argel* acetonic, methanolic and aqueous extracts and those of its essential oil.

Key words: *Solenostemma argel*, LCMS, GCMS, RMN, pharmacological activity

Résumé

Solenostemma argel est une plante tropicale poussant dans le désert algérien ; elle est utilisée traditionnellement pour le traitement de plusieurs maladies. Le but de cette étude est de démontrer l'innocuité et les effets antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoires, anti-nociceptifs, cicatrisants, antiulcéreux et antidiabétiques des extraits acétoniques (SAAC), méthanoliques (SAME) et aqueux (SAAQ) de *S. argel* et celles de son huile essentielle (SAHE). La composition des extraits SAAC, SAME et SAAQ ont été établie par UHPLC/DAD/ESI-MS2 et celle de SAHE a été réalisée par GC-MS et RMN. L'analyse LCMS a permis d'identifier 16 composants pour SAAC et 28 composants pour SAME et SAAQ, respectivement. Vingt composants ont été caractérisés pour SAHE, dont le linalol (57,10 %), le terpinéol (12,95 %), le trans-géraniol (12,65 %) et le nérol (4,67 %). Le composé principal linalol a été isolé par RMN. La toxicité des produits a été évaluée par un test de toxicité aiguë et un test de toxicité cutanée. L'activité antioxydante de SAAC, SAME et SAAQ a été réalisée par un test de piégeage du radical DPPH. Les extraits ont exprimé une activité anti-radicalaire maximale avec des valeurs d'IC₅₀ comprises entre 17,33 et 36,05 µg/ml. L'activité antimicrobienne a été testée par les méthodes de diffusion sur gélose et de microdilutions pour les CMI et CMB. SAHE et le linalol ont montré une activité antibactérienne significative contre toutes les bactéries testées. Les effets anti-inflammatoires de SAHE, SAAC, SAME et SAAQ ont été déterminés par trois modèles expérimentaux: œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat, œdème de l'oreille induit par le xylène et granulome induit par les pellets de coton chez le rat. Les extraits et SAHE aux doses de 250 et 400 mg/kg ont significativement réduit l'œdème de la patte induit par la carragénine avec des taux allant de 63,31 % à 89,83 % 6h après l'injection de carragénine. Les extraits et SAHE ont également produit un effet anti-inflammatoire dose-dépendant significatif contre l'œdème de l'oreille induit par le xylène et la formation de granulome induite par les pellets de coton chez les rats. De plus, l'activité anti-nociceptive des extraits et de SAHE ont été évaluées par le test sur plaque chauffante, le test de contorsion et le test au formaldéhyde. Les extraits et SAHE à 250 et 400 mg/kg ont significativement réduit les contorsions induites par l'acide acétique avec des taux allant de 56,83 % à 92,41 %. L'administration orale des extraits et de SAHE aux doses de 250 et 400 mg/kg a provoqué un effet anti-nociceptif dose-dépendant significatif dans les phases neurogènes et inflammatoires induites par le formol. Les extraits et SAHE ont également eu un impact sur la latence de la douleur dans le test de la plaque chauffante. L'activité cicatrisante a été évaluée dans un modèle d'excision chez le rat. La réduction des plaies entre le 2^{ème} et le 10^{ème} jour était significativement plus élevée ($p < 0,05$) pour les plaies traitées respectivement par les extraits et SAHE que pour les plaies non traitées. L'étude de l'effet antiulcéreux s'est faite selon deux modèles chez le rat : l'ulcère gastrique induit par l'aspirine et l'ulcère gastrique induit par la ligature du pylore. Dans les deux tests, l'indice d'ulcère est significativement ($p < 0,05$) réduit chez les rats traités par les extraits et SAHE comparativement aux rats non traités. L'activité antidiabétique des extraits a été réalisée selon le modèle du diabète induit par l'alloxane chez le rat. Les extraits ont provoqué des effets hypoglycémiques et hypolipémiants très significatifs par rapport au témoin. De plus, SAAQ a exprimé un effet neuroprotecteur très intéressant. La présente étude a démontré les effets antioxydants, antimicrobiens, anti-inflammatoires, anti-nociceptifs, cicatrisants, antiulcéreux et antidiabétiques des extraits acétoniques, méthanoliques et aqueux de *S. argel* ainsi que ceux de son huile essentielle.

Mots clés : *Solenostemma argel*, LCMS, GCMS, RMN, activité pharmacologique

Solenostemma argel هو نبات استوائي ينمو في الصحراء الجزائرية ويستخدم تقليدياً لعلاج العديد من الأمراض. الغرض من هذه الدراسة هو إثبات تأثيرات مستخلصات الأسيتون ومضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات ومضادات الالتهاب ومضادات الألم والتنام الجروح ومضادة للقرحة والسكري لمستخلصات الأسيتون ((SAAC) والميثانول ((SAME) والمستخلصات المائية ((SAAQ ل *S. argel* وتلك الموجودة في الزيت العطري ((SAHE).

تم إنشاء تركيبة المستخلصات النباتية SAAC و SAME و SAAQ بواسطة UHPLC/ DAD/ ESI-MS2 و تم تنفيذ تركيبة SAHE بواسطة GC-MS و NMR.

تحليل LCMS حدد 16 مكوناً ل SAAC و 28 مكوناً ل SAME و SAAQ ، على التوالي. تم تمييز عشرين مركباً ل SAHE ، بما في ذلك linalool (لinalool 57.10) % (terpineol 12.95) % (nerol 4.67) % (trans-geraniol 12.65) % (عبرجيرانيول و nerol 4.67) %.

تم عزل المركب الرئيسي linalool لinalool بواسطة RMN. تم تقييم سمية المنتجات عن طريق اختبار السمية الحادة واختبار سمية الجلد. تم إجراء النشاط المضاد للأكسدة ل SAAC و SAME و SAAQ بواسطة اختبار الكسح الجذري DPPH. عُبِّرَت المستخلصات عن أقصى نشاط مضاد للجذور بقيم IC50 بين (17.33 و 36.05) ميكروغرام / مل. تم اختبار النشاط المضاد للميكروبات من خلال طرق نشر أجار gélose والتخفيف الدقيق ل CMI و CMB. أظهر SAHE و linalool نشاطاً كبيراً مضاداً للبكتيريا ضد جميع البكتيريا التي تم اختبارها.

تم تحديد التأثيرات المضادة للالتهابات ل SAHE و SAAC و SAME و SAAQ من خلال ثلاثة نماذج تجريبية: وذمة القدم التي تسببها الكاراجينين في الجرذان ، وذمة الأذن التي يسببها الزيلين والورم الحبيبي الناجم عن حبيبات القطن في الجرذان.

خفضت مستخلصات SAHE جرعات 250 و 400 مجم / كجم بشكل ملحوظ من وذمة القدم التي يسببها الكاراجينان بمعدلات تتراوح من 63.31% إلى 89.83% بعد 6 ساعات من حقن الكاراجينان.

أنتجت مستخلصات SAHE أيضاً تأثيراً كبيراً مضاداً للالتهابات يعتمد على الجرعة ضد وذمة الأذن التي يسببها الزيلين (xylène) وتشكيل الورم الحبيبي الناجم عن حبيبات القطن في الفرن.

بالإضافة إلى ذلك ، تم تقييم النشاط المضاد للألم للمستخلصات و SAHE من خلال اختبار الصفیحة الساخنة واختبار الالتواء واختبار الفورمالديهايد. المستخلصات و SAHE عند 250 و 400 ملغم / كغم قللت بشكل كبير من التواء الناجم عن حمض الأسيتيك بنسب تتراوح من 56.83% إلى 92.41%. تسبب إعطاء المستخلصات عن طريق الفم و SAHE جرعات 250 و 400 مجم / كجم في تأثير مضاد للألم يعتمد على الجرعة بشكل كبير في المراحل العصبية والالتهابية التي يسببها الفورمالين (formaldéhyde).

أثرت المستخلصات و SAHE أيضاً على زمن انتقال الألم في اختبار اللوح الساخن. تم تقييم نشاط الشفاء في نموذج استئصال الفران.

كان الانخفاض في الجروح بين اليوم الثاني والعاشر أعلى معنويًا ($p > 0.05$) للجروح المعالجة بالمستخلصات و SAHE على التوالي مقارنة بالجروح غير المعالجة.

أجريت دراسة التأثير المضاد للقرحة على نموذجين في الجرذان: قرحة المعدة الناتجة عن الأسبرين وقرحة المعدة الناتجة عن ربط البواب. في كلا الاختبارين ، انخفض مؤشر القرحة معنويًا ($p > 0.05$) في الفران المعالجة بالمستخلصات و SAHE مقارنة بالفران غير المعالجة. تم إجراء النشاط المضاد لمرض السكر في المستخلصات وفقاً لنموذج مرض السكري الذي يسببه الألوكسان في الفران. تسببت المستخلصات في تأثيرات خافضة لسكر الدم وخافضة للدهون معنوية للغاية مقارنة بالمجموعة الضابطة. علاوة على ذلك ، أعرب SAAQ عن تأثير مثير للاهتمام في الأعصاب. أظهرت الدراسة الحالية التأثيرات المضادة للأكسدة والميكروبات والالتهابات ومضادة للألم والشفاء ومضادة للقرحة ومضادة لمرض السكر من الأسيتون والميثانول والمستخلصات المائية من *S. argel* وكذلك تلك الموجودة في الزيت العطري.

الكلمات المفتاحية: *Solenostemma argel* ، LCMS ، GCMS ، NMR ، النشاط الدوائي

Dédicaces

A mes chers parents,

*Votre soutien sans réserve et vos encouragements m'ont permis d'affronter beaucoup d'épreuves.
Ce travail vous est dédié. A vous : toute ma reconnaissance. L'amour et le respect que j'ai
pour vous sont incommensurables. Que Dieu vous protège et vous garde.*

*A toi papa, tu m'as toujours soutenu, encouragé et rassuré dans les moments difficiles.
Tu as toujours été mon modèle de volonté, de courage et de réussite. Aucun mot ne
saurait t'exprimer ma vive gratitude et ma reconnaissance infinie.*

*A toi maman, tu m'as tellement donné aussi que je n'ai pas assez de mots pour
t'exprimer, tout d'abord ma reconnaissance et ma plus profonde tendresse.*

A Oussama,

Merci pour ton soutien indéfectible en toute épreuve

A Fouad,

Cher « frangin »

A Sarah,

Chère « belle sœur », merci pour ton aide

A Elias,

Mon cher neveu adoré

Remerciements

Mes remerciements et ma reconnaissance sont adressés à madame *BENMAHDI Meriem Hind*, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, pour la confiance qu'elle m'a accordé en acceptant d'encadrer ce travail et pour ses conseils avisés tout au long de ce parcours.

A madame *AZZAG Nawel* Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger, Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Hommages distingués.

A Madame le Professeur *KORICHI OUAR Mounira* pour avoir bien voulu accepter d'être membre examinateur du jury. Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur *BOUDIS Hakim* pour avoir bien voulu accepter d'être membre examinateur du jury. Sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur *BESSEKOUAD Yassine* pour avoir bien voulu accepter d'être membre examinateur du jury ainsi que pour son soutien inestimable, que ce soit par l'accès privilégié au laboratoire de Chimie Solaire de l'Institut de Chimie de l'Université Houari Boumediene et ses conseils judicieux , Sincères remerciements.

A Monsieur le Dr *CHIKHOUNE Anis* pour avoir bien voulu accepter d'être membre examinateur du jury. Sincères remerciements.

Mes remerciements les plus chaleureux vont aussi à Madame *BENDISSARI BOUZID Kheira*, Professeur au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU Benî-Messous, pour ses grandes qualités humaines, qui a bien voulu m'accepter dans son service et de m'avoir consacré beaucoup de son temps pour me conseiller et m'aider à réaliser l'étude anatomopathologique de mon travail.

A Monsieur le *Dr CHINA Bernard*, à votre dévouement, votre gentillesse et votre implication sans égale. Mon respect le plus profond.

Je remercie également toute l'équipe du *Laboratoire de recherche de phytochimie de l'université d'Aveiro - Portugal* et en particulier le *Professeur Diana PINTO* pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe et pour m'avoir transmis les connaissances et le savoir faire requis en analyses phytochimiques.

Mes sincères remerciements vont à Madame *ZENIA Safia, enseignante à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire*, pour l'aide et le temps qu'elle m'a consacré pour la réalisation de l'étude statistique de mon travail.

Mes sincères remerciements sont adressés à Madame *Dr DJELLOUT Baya, enseignante à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire* pour l'aide et le soutien inestimable qu'elle m'a apporté.

Mes sincères remerciements vont au *Professeur LAMARA Ali, enseignant à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire* pour son soutien et son aide.

A Madame le *Professeur AIT-OUDHIA Khatima* pour son soutien indéfectible.
Sincères remerciements.

À tous les enseignants de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire que j'ai eu ; merci de m'avoir guidé là où je suis maintenant.

Mes vifs remerciements vont également aux *Dr BOULAHLIB Soumia et Dr ALIBOUDRAH Hamza* pour leur aide et leur conseils précieux en chimie.

Je remercie également Mademoiselle *ZOUAOUI Meriem, Ingénieur au laboratoire pédagogique de biochimie de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire* pour son aide et sa disponibilité.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel du *Service d'Anatomopathologie du CHU de Beni-Messous* pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont toujours réservé et pour leur aide, en particulier Madame *BENSEDIRA Hanane*, plus qu'une collègue, une amie.

Mes sincères remerciements au personnel du *Département de Zoologie du Jardin d'Essai d'EL-HAMA*, notamment *Dr LAIEB Amina*, *Dr KHOUCHEANE Nezha* et l'ingénieur madame *UGAD Amina*.

A Amina Laib, ton dévouement est digne de celui d'une véritable sœur, merci

A Amina Benfenatki, ma sœur de cœur

A Houda Hattab, merci pour tout ma chère amie

Mes remerciements vont également à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

LISTE DES ABREVIATIONS

ALT :	Alanine-AminoTransférase
ABTS :	2,2 Azinobis 3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonic Acid
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AFMPS :	Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé
AGE :	Produits de la glycation avancée
AINS :	Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
ANOVA :	ANalysis Of VAriance
APG :	Angiosperm Phylogeny Group
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
AST :	ASpartate-AminoTransférase
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
CHU :	Centre Hospitalo-Universitaire
CIBAC :	Association universitaire créteil- Paris
CLSI :	Cinical and Laboratory Standars Institute
cm :	Centimètre
CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CO₂	Gaz carbonique
COX1 :	Cyclooxygénase 1
COX2 :	Cyclooxygénase 2
CRP :	Protéine C Réactive
CT :	Cholestérol Total
CuPRAC :	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DAG ::	Diacylglycérol
DMSO :	DiMéthylSulfOxyde
DPP-H :	2,2-Diphényl 1 picrylhydrazyle
EGF :	Epidermal Growth Factor
eV :	Electron Volt
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FOX :	Ferrous Oxidation Xylenol
FRAP :	Ferric Reducing Antioxidant Power
g :	Gramme
g/kg :	Gramme par kilogramme
GABA-A :	Acide γ -aminobutyrique
GC :	Chromatographie Gazeuse
GC-GC :	Chromatographie Gazeuse bidimensionnelle
GC-MS :	Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectroscopie de Masse
GOT :	GlutamoOxaloacétate Transférase
GPT :	GlutamoPyruvate Transférase
GSH-Px :	Glutathion Peroxydase
h :	Heure
HCl :	Acide Chlorhydrique
HMGB1 :	High Mobility Group Box 1
HORAC :	Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity

HPLC :	Chromatographie Liquide Haute Performance
HPTLC :	Chromatographie sur Couche Mince Haute Performance
HRP :	Peroxydase
HSP-70 :	Heat Shock Protein 70
i.p :	Intra-péritonéale
IDT :	Ion Trap Detector
IGF-1 :	Insulin Growth Factor-1
IgG2a	Immunoglobulin G2a (Polyclonal Rabbit Anti Mouse
IKK :	IKappaB Kinase
IL-1 β	Interleukine 1 Beta
IL-6 :	Interleukine 6
IL-8 :	Interleukine 8
iNOS :	Oxyde Nitrique Synthase
IR :	Infrarouge
IRAK4 :	Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 4
JAK-STAT :	Janus Kinase Signal Transducer and Activator of Transcription
K⁺ :	Potassium
KGF :	Keratinocyte Growth Factor
Km :	Kilomètre
LC-MS :	Chromatographie Liquide couplée à la Spectroscopie de Masse
LC-RMN :	Chromatographie Liquide couplée à la Résonance Magnétique Nucléaire
m :	Mètre
MCP-1 :	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MD-GC :	Chromatographie Gazeuse Multidimensionnelle
mg/dl :	Milligramme par décilitre
mg/kg :	Milligramme par Kilogramme
mg/ml :	Milligramme par Millilitre
MH :	Muller Hinton
Min :	Minute
ml :	Millilitre
mm :	Millimètre
mm/j :	Millimètre par jour
mm² :	Millimètre carré
mm-Hg :	Millimètre mercure
MPO :	Myéloperoxydase
MS :	Spectroscopie de Masse
MVDA :	Analyse de Données Multi-Variées
MyD88 :	Myeloid Differentiation primary response 88
N :	Normalité
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NF-κB :	Nuclear Factor-kappa B
nm:	Nanomètre
NO :	Oxyde Nitrique
OCDE :	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
ORAC :	Oxygen Radical Absorbance Capacity
P.C :	Poids Corporel
p38 MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
PAF	Facteur d'Activation Plaquettaire
PAL :	Phosphatase Alcaline
PBS	Tampon phosphate salin

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandine E2
PGI2	Prostacycline
pH :	Potentiel Hydrogène
PKC	Proteine Kinase C
PKC :	Protein kinase C
R&D :	Recherche et Développement
RMN ::	Résonance Magnétique Nucléaire
RNS :	Espèces réactives de l'azote
ROS :	Espèces Réactives de l'Oxygène
RSS :	Espèces réactives du soufre
s.c :	Sous-cutané
SAAC :	Extrait acétonique de <i>S.argel</i>
SAAQ :	Extrait aqueux de <i>S.argel</i>
SAHE :	Huile essentielle de <i>S.argel</i>
SAME :	Extrait méthanolique de <i>S.argel</i>
Ser516 :	Serine 516
Ser529 :	Serine 529
SFC :	Chromatographie en Fluide Supercritique
SFE :	Extraction par fluide supercritique
SGH :	Système Général Harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques
SGH :	Système de classification Globalement Harmonisé
SOD :	Super Oxyde Dismutase
STZ :	Streptozotocine
TG :	Triglycérides
TGFα, β :	Transforming Growth Factor α et β
TIRAP :	Toll Interleukin 1 Receptor domain-containing Adaptor Protein
TLR :	Récepteur Toll-Like
TNFα :	Tumor Necrosis Factor α
TNFγ :	Tumor Necrosis Factor γ
TRAF6 :	Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6
TRPV1 :	Transient Receptor Potential Vanilloid type 1
UI/L :	Unités Internationales par Litre
US-EPA :	United States Environmental Protection Agency
UV :	Ultraviolets
vIPAG :	Circuit descendant de la matière grise périaqueducule ventrolatérale
WHO :	World Health Organization
$\mu\text{g}/\text{cm}^2$:	Microgramme par Centimètre carré
μm :	Micromètre
μm :	Micromètre
λ :	Landa
CO₂ :	Gaz carbonique
(1/1) :	Volume par Volume
% :	Pour Cent
°C :	Degré Celsius

Liste des tableaux

Tableau 1.	Tests pharmacologiques pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	37
Tableau 2.	Tests de nociception <i>in vivo</i>	39
Tableau 3.	Tests spectrophotométriques pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante <i>in vitro</i>	51
Tableau 4.	Méthodes fréquentes d'évaluation de la sensibilité aux antibactériens.....	53
Tableau 5.	Résultats de l'enquête ethnobotanique sur l'utilisation ancestrale de <i>S.argel</i> par le peuple Touareg.....	62
Tableau 6.	Dosages des polyphénols et des flavonoïdes totaux.....	69
Tableau 7.	Identification des données UHPLC / DAD / ESI-MS ² de l'extrait acétonique de <i>S.argel</i>	71
Tableau 8.	Identification des données UHPLC / DAD / ESI-MS ² de l'extrait méthanolique de <i>S.argel</i>	72
Tableau 9.	Identification des données UHPLC / DAD / ESI-MS ² de l'extrait aqueux lyophilisé de <i>S.argel</i>	75
Tableau 10.	Identification des données GCMS de l'huile essentielle de <i>S. argel</i>	81
Tableau 11.	Suivi des Poids corporels des rats lors de l'étude de la toxicité aigüe des extraits et de l'huile essentielle de <i>S. argel</i>	89
Tableau 12.	Poids des organes prélevés lors de l'étude de la toxicité aigüe des extraits et de l'huile essentielle de <i>S. argel</i>	89
Tableau 13.	Résultats des paramètres biochimiques obtenus lors de l'étude de la toxicité aigüe des extraits et de l'huile essentielle de <i>S. argel</i>	90
Tableau 14.	Taux de mortalité et CL ₅₀ enregistrés au cours de l'activité cytotoxique de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de <i>S.argel</i>	105
Tableau 15.	Activité antioxydante des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux lyophilisé (SAAQ) de <i>S.argel</i>	113
Tableau 16.	Souches bactériennes testées.....	115
Tableau 17.	Liste du matériel, des milieux et des réactifs utilisés.....	115
Tableau 18.	Diamètres d'inhibition (mm) de la gentamicine, le linalol et l'huile essentielle de <i>S. argel</i> contre les bactéries testées.....	117
Tableau 19.	Valeurs des CMI et CMB de l'huile essentielle de <i>S. argel</i> et du linalol.....	121
Tableau 20.	Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de <i>S. argel</i> sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.....	132
Tableau 21.	Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de <i>S. argel</i> sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris.....	134
Tableau 22.	Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) des feuilles de <i>S. argel</i> sur le granulome induit par les pellets de coton chez le rat..	136
Tableau 23.	Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de <i>S. argel</i> sur les crampes abdominales induites par l'acide acétique chez la souris.....	138

Tableau 24.	Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de <i>S. argel</i> sur la douleur induite par le formaldéhyde chez le rat.....	140
Tableau 25.	Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de <i>S. argel</i> sur la douleur centrale induite par un stimulus thermique chez la souris.....	142
Tableau 26.	Pourcentages de contraction et période d'épithélialisation des plaies traitées par les pommades et la crème à base d'extraits et d'huile essentielle de <i>S. argel</i>	152
Tableau 27.	Effets des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) ainsi que de l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de <i>S. argel</i> sur l'ulcère gastrique induit par l'aspirine chez le rat.....	161
Tableau 28.	Effets des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) ainsi que de l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de <i>S. argel</i> sur l'ulcère gastrique induit par ligature du pylore chez le rat.....	164
Tableau 29.	Effets des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de <i>S. argel</i> sur le taux de glycémie.....	174
Tableau 30.	Effets des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de <i>S. argel</i> sur le profil lipidique.....	176
Tableau 31.	Effets des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de <i>S. argel</i> sur les fonctions hépatique et rénale.....	177
Tableau 32.	Résultats de l'évaluation histopathologique de l'effet neuroprotecteur des extraits SAAQ, SAAC et SAME lors du diabète induit par l'alloxane chez le rat.....	180
Tableau 33.	Intensité d'expression de la HSP70 suite à l'immunohistochimie du cortex cérébral chez les différents groupes mis en expérimentation.....	184
Tableau 34.	Effet de l'extrait aqueux de <i>S. argel</i> sur les paramètres physicochimiques de l'eau des aquariums expérimentaux.....	225

Liste des figures

Figure 1.	Classification de la famille des <i>Asclepiadaceae</i>	4
Figure 2.	Distribution géographique de <i>Solenostemma argel</i>	7
Figure 3.	Lignée taxonomique de <i>Solenostemma argel</i>	7
Figure 4.	Arbrisseau et fleur de <i>Solenostemma argel</i>	8
Figure 5.	Fruit de <i>Solenostemma argel</i>	9
Figure 6.	Facteurs influençant le choix du solvant d'extraction.....	14
Figure 7.	Schéma du dispositif d'extraction par Soxhlet.....	16
Figure 8.	Représentation schématique des groupes de composés phénoliques chez les plantes.....	18
Figure 9.	Structures chimiques de certaines coumarines.....	19
Figure 10.	Structures chimiques de base des différentes classes de Flavonoïdes.....	20
Figure 11.	Exemples d'alcaloïdes utilisés dans le domaine médical.....	21
Figure 12.	Structure de base des saponines: triterpénoïde et stéroïde.....	22
Figure 13.	Schéma du dispositif d'extraction par hydro-distillation (système Clevenger)	24
Figure 14.	Schéma d'une unité de distillation à la vapeur pour l'extraction des huiles essentielles.....	25
Figure 15.	Structures chimiques de certains composants des huiles essentielles.....	28
Figure 16.	Composition d'un appareil de CHLP.....	31
Figure 17.	Etapes impliquées dans la réponse inflammatoire d'un tissu.....	36
Figure 18.	Schéma simplifié des principales voies nociceptives.....	38
Figure 19.	Phases de la cicatrisation.....	40
Figure 20.	Stades de développement de l'ulcère gastrique.....	42
Figure 21.	Physiopathogénie du diabète.....	47
Figure 22.	Carte topographique du Parc National de l'Ahaggar.....	57
Figure 23.	Carte topographique du site d'étude Abalessa.....	58
Figure 24.	Site d'étude « Abalessa » Tamanrasset.....	58
Figure 25.	Cueillette de <i>S. argel</i> au site d'Abalessa- Tamanrasset	59
Figure 26.	Parties de <i>S. argel</i> utilisées par la population Touareg de l'Ahaggar.....	60
Figure 27.	Affections traitées par <i>Solenostemma argel</i> au sein de la population Touareg.....	61
Figure 28.	Procédé d'extraction de l'extrait acétonique de <i>S. argel</i>	64
Figure 29.	Procédé d'extraction de l'extrait méthanolique de <i>S. argel</i>	65
Figure 30.	Procédé d'extraction de l'extrait aqueux lyophilisé de <i>S. argel</i>	66
Figure 31.	Extraction de l'huile essentielle de <i>S. argel</i> par hydrodistillation.....	67
Figure 32.	Réaction de réduction du réactif Folin-Ciocalteu par oxydation des phénols présents dans l'extrait.....	68
Figure 33.	Principe de quantification des flavonoïdes par la méthode de chlorure d'aluminium.....	69
Figure 34.	Chromatogramme UHPLC de l'extrait acétonique de <i>S. argel</i> enregistré à 370 nm...	72
Figure 35.	Chromatogramme UHPLC de l'extrait méthanolique de <i>S. argel</i> enregistré à 370 nm.....	74
Figure 36.	Chromatogramme UHPLC de l'extrait aqueux de <i>S. argel</i> enregistré à 370 nm.....	76
Figure 37.	Chromatogramme GCMS de l'huile essentielle <i>S. argel</i>	80
Figure 38.	Spectre RMN 1H de l'huile essentielle de <i>S. argel</i> et structure du Linalol avec numérotation IUPAC.....	84

Figure 39.	Spectres RMN bidimensionnelle COSY, HSQC et HMBC de l'huile essentielle de <i>S. argel</i>	85
Figure 40.	Schéma principal de l'étude de la toxicité aigüe.....	86
Figure 41.	Microphotographies des organes prélevés du groupe témoin.....	91
Figure 42.	Microphotographies des foies des rats traités par l'extrait acétonique de <i>S. argel</i>	92
Figure 43.	Microphotographies des reins des rats traités par l'extrait acétonique de <i>S. argel</i>	93
Figure 44.	Microphotographies des poumons des rats traités par l'extrait acétonique de <i>S. argel</i>	94
Figure 45.	Microphotographies des foies des rats traités par l'extrait méthanolique de <i>S. argel</i>	95
Figure 46.	Microphotographies des poumons des rats traités par l'extrait méthanolique de <i>S. argel</i>	96
Figure 47.	Microphotographies des reins des rats traités par l'extrait méthanolique de <i>S. argel</i>	97
Figure 48.	Microphotographies des foies des rats traités par l'extrait aqueux lyophilisé de <i>S. argel</i>	98
Figure 49.	Microphotographies des poumons des rats traités par l'extrait aqueux lyophilisé de <i>S. argel</i>	99
Figure 50.	Microphotographies du parenchyme splénique des rats traités par l'extrait aqueux lyophilisé de <i>S. argel</i>	100
Figure 51.	Microphotographies du foie et des poumons des rats traités par l'huile essentielle de <i>S. argel</i>	101
Figure 52.	Taux de mortalité des nauplii d' <i>Artemia salina</i> en fonction des doses de l'huile essentielle et des extraits de <i>S. argel</i> testées.....	106
Figure 53.	Courbes de régression des probits en fonction du log décimal des doses testées du bichromate de potassium et des extraits et l'huile essentielle de <i>S. argel</i>	107
Figure 54.	Principe du test de l'activité anti-oxydante par le radical DPPH.....	112
Figure 55.	Schéma de la disposition des disques lors du test de diffusion sur gélose des extraits et huile essentielle de <i>S. argel</i>	116
Figure 56.	Diamètres d'inhibition de la gentamicine, le linalol et l'huile essentielle de <i>S. argel</i> contre les bactéries testées.....	118
Figure 57.	Droite de régression des diamètres d'inhibition de l'huile essentielle de <i>S. argel</i> en fonction du linalol à 57%.....	119
Figure 58.	Détermination des CMI par microdilution sur microplaques A: Gentamicine ; B: Huile essentielle <i>S. argel</i> ; C: Linalol.....	122
Figure 59.	Evolution des surfaces moyennes des plaies traitées par les pommades et la crème à base d'extraits et d'huile essentielle de <i>S. argel</i> en fonction du temps.....	151
Figure 60.	Représentation graphique de la période d'épithélialisation des plaies traitées par les pommades et la crème à base d'extraits et d'huile essentielle de <i>S. argel</i>	163
Figure 61.	Micrographies de la peau, coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline / Eosine (1) et Trichrome (2).....	154
Figure 62.	Evolution en images des surfaces des plaies lors de l'activité cicatrisante de <i>S. argel</i>	156
Figure 63.	Photographies (1) et micrographies (2) de l'estomac lors du test de l'ulcère gastrique induit par l'aspirine chez le rat, coupes histologiques colorées à l'hématoxyline/éosine.....	162

Figure 64.	Photographies (1) et micrographies (2) de l'estomac lors du test de ligature du pylore chez le rat, coupes histologiques colorées à l'hématoxyline/éosine.....	165
Figure 65.	Schéma expérimental de l'activité antidiabétique des extraits de <i>S. argel</i> selon le modèle du diabète induit chez les rats par l'Alloxane.....	170
Figure 66.	Suivi hebdomadaire des poids des rats au cours de l'activité antidiabétique des extraits de <i>S. argel</i>	173
Figure 67.	Effets des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de <i>S. argel</i> sur le taux de glycémie.....	174
Figure 68.	Micrographies du pancréas, coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline / Eosine.....	175
Figure 69.	Micrographies du foie, coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline / Eosine.	178
Figure 70.	Micrographies du foie, coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline / Eosine..	179
Figure 71.	Représentations graphiques des lésions recherchées au cours de la neuro-dégénérescence liée au diabète.....	180
Figure 72.	Micrographies du cortex cérébral, coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline / Eosine.....	182
Figure 73.	Micrographies du cortex cérébral, coupes histologiques colorées par le violet de crésyl.....	183
Figure 74.	Intensité d'expression de la HSP70 au niveau du cortex cérébral pour les différents groupes mis.....	184
Figure 75.	Micrographies du cortex cérébral, coupes histologiques colorées par l'HSP70.....	185
Figure 76.	Erythème, hyperpigmentation et lichénification du scrotum.....	192
Figure 77.	Microphotographies des levures <i>Malassezia pachydermatis</i> à partir des prélèvements cutanés réalisés au niveau du scrotum.....	193
Figure 78.	Plaie ulcérée au niveau du scrotum.....	194
Figure 79.	Photos représentatives de l'évolution dans le temps du processus de cicatrisation de la plaie ulcérée traitée par la crème SAHE 1%.....	194
Figure 80.	Brûlure au troisième degré.....	195
Figure 81.	Traitement de la brûlure par la crème SAHE 1%.....	196
Figure 82.	Photos représentatives de l'évolution dans le temps du processus de cicatrisation de la brûlure traitée par la crème SAHE 1%.....	197
Figure 83.	Escarres de décubitus chez le chien Rex.....	199
Figure 84.	Radiographie du bassin du chien Rex (Flèches blanches: Ostéophytes).....	199
Figure 85.	Cicatrisation complète des escarres de Rex avec repousse des poils.....	200
Figure 86.	Amputation du membre au niveau de l'articulation coxo-fémorale.....	202
Figure 87.	Application de la crème SAHE 1% sur la plaie de la tortue.....	202
Figure 88.	Evolution dans le temps du processus de cicatrisation du moignon du membre amputé.....	203
Figure 89.	Automutilation de la queue chez un loup doré d'Afrique.....	204
Figure 90.	Queue du loup doré d'Afrique après traitement par la crème SAHE 1%.....	205
Figure 91.	Plaies cutanées chez un couple de faisan.....	206
Figure 92.	Traitement des plaies par la crème SAHE 1%.....	207
Figure 93.	Cicatrisation des plaies cutanées des faisans.....	207
Figure 94.	Cycle évolutif de l'habronérose.....	209

Figure 95.	Plaies d'été chez les juments Nedjma et Elza.....	210
Figure 96.	Evolution dans le temps des surfaces des plaies traitées par SAHE 1%.....	210
Figure 97.	Evolution en photos de la plaie d'été de la jument Nedjma après traitement par la crème à l'huile essentielle de <i>S.argel</i> (SAHE 1%)......	211
Figure 98.	Evolution en photos de la plaie d'été de la jument Elza après traitement par la crème à l'huile esentielle de <i>S.argel</i> (SAHE 1%)......	212
Figure 99.	Chalet bleu du jardin d'essai.....	213
Figure 100.	Diagnose de la puce <i>ctenocephalides felis</i> prélevée au sein du bâtiment d'aquaculture (photos réelles prises au microscope optique Gx4).....	214
Figure 101.	Volière des perruches ondulées du zoo du jardin d'essai.....	215
Figure 102.	Ténébrions retrouvées sur les nids des perruches ondulées <i>Melopsittacus undulatus</i>	216
Figure 103.	Ténébrions <i>Alphitobius diaperinus</i> (5,5-6 mm).....	216
Figure 104.	Microphotographie de <i>Dermanyssus gallinae</i> et <i>Malassezia Spp</i> prélevés à partir des perruches ondulées.	217
Figure 105.	Micrographies des prélèvements réalisés après traitement par l'extrait aqueux de <i>S.argel</i>	218
Figure 106.	Représentation schématique des aquariums hôpitaux mis en expérimentation (schéma thérapeutique).....	222
Figure 107.	<i>Xiphophorus helleri</i> paarasité (Photo personnelle).....	223
Figure 108.	<i>Lernaea cyprinacea</i> (Photos réelles). (A): <i>Lernaea cyprinacea</i> , (B): Sac ovarien avec œufs.....	224
Figure 109.	<i>Lernaea cyprinacea</i>	224
Figure 110.	<i>Lernaea cyprinacea</i> décomposé après traitement par l'extrait aqueux de <i>Solenostemma argel</i> (Photo personnelle).....	225
Figure 111.	Iconographies des <i>Xiphophorus hellerii</i> parasités par <i>Lernaea cyprinacea</i> , colorées avec l'hématoxyline et l'éosine.....	226

TABLE DES MATIERES

Résumés (Anglais Français, Arabe)
Dédicaces
Remerciements
Liste des abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures

Introduction Générale.....	1
-----------------------------------	----------

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. Monographie de la plante étudiée : <i>Solenostemma argel</i>.....	4
--	----------

I.1.Présentation de la famille des <i>Asclepiadaceae</i>	4
I.1.1. Généralités	4
I.1.2. Classification de la famille des <i>Asclepiadaceae</i>	4
I.1.3. Description botanique	5
I.2. Présentation du genre <i>Cynanchum</i> ou <i>Solenostemma</i>	5
I.3. Présentation de l'espèce <i>Solenostemma argel</i> (Del.) Hayne	6
I.3.1. Nomenclature	6
I.3.2. Distribution géographique	6
I.3.3. Classification	7
I.3.4. Description botanique	8
I.3.5. Utilisations ethnobotaniques	9
I.3.6. Métabolites secondaires	10
I.3.7. Propriétés pharmacologiques	11

Chapitre II : Extraction et screening phytochimique.....	13
---	-----------

II.1.Extraits de plantes médicinales	13
II.1.1. Choix du solvant.....	13
II.1.2. Méthodes d'extraction.....	14
II.1.2.1. Macération.....	14
II.1.2.2. Infusion.....	15
II.1.2.3. Décoction.....	15
II.1.2.4. Percolation.....	15
II.1.2.5. Extraction par soxhlet	16
II.1.2.6. Extraction par ultrasons.....	16
II.1.2.7. Extraction assistée par micro-ondes.....	17
II.1.2.8. Extraction par fluide supercritique.....	17
II.1.3. Métabolites secondaires des extraits de plantes médicinales.....	18
II.1.3.1. Phénols.....	18
II.1.3.1.1. Phénols simples.....	19
II.1.3.1.1.1. Acides phénoliques.....	19
II.1.3.1.1.2. Coumarines.....	19
II.1.3.1.2. Polyphénols.....	20

II.1.3.1.2.1. Flavonoïdes.....	20
II.1.3.1.2.2. Tanins.....	21
II.1.3.2. Alcaloïdes.....	21
II.1.3.3.Saponosides.....	22
II.2. Extraits de plantes aromatiques.....	22
II.2.1. Concrète	22
II.2.2. Absolue	23
II.2.3. Huile essentielle.....	23
II.2.3.1.Méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	23
II.2.3.1.1. Hydrodistillation.....	23
II.2.3.1.1.1. Distillation à l'eau.....	24
II.2.3.1.1.2. Distillation à l'eau et à la vapeur.....	24
II.2.3.1.1.3. Distillation directe à la vapeur.....	25
II.2.3.1.2. Extraction par expression.....	26
II.2.3.1.3. Extraction par solvant.....	26
II.2.3.1.4. Extraction par enfleurage.....	27
II.2.3.1.5. Hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	27
II.2.3.2.Composants chimiques des huiles essentielles.....	27
II.2.3.2.1. Terpènes.....	28
II.2.3.2.1.1. Monoterpènes.....	29
II.2.3.2.1.2. Sesquiterpènes.....	29
II.2.3.2.2. Composés aromatiques.....	29
II.3. Méthodes d'analyses.....	29
II.3.1. CCM / HPTLC.....	29
II.3.2. Chromatographie liquide haute performance (CHLP ou HPLC).....	30
II.3.3.Chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS).....	31
II.3.4. Chromatographie liquide couplée à la résonance magnétique nucléaire.....	31
II.3.5. Chromatographie gazeuse (GC).....	32
II.3.6.Chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS).....	32
II.3.7. Chromatographie en fluide supercritique.....	32
II.3.8. Méthodes spectroscopiques.....	33
II.3.8.1. Spectroscopie de masse (MS).....	33
II.3.8.2. Spectroscopie ultraviolette (UV).....	33
II.3.8.3. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN).....	34
II.3.8.4. Spectroscopie infrarouge.....	34
Chapitre III : Activités pharmacologiques.....	35
III.1. Activité anti-inflammatoire.....	35
III.1.1.Tests in vivo.....	36
III.1.2. Tests in vitro.....	37
III.2. Activité antalgique.....	37
III.3. Activité cicatrisante.....	40
III.4. Activité antiulcéreuse.....	41
III.4.1. Ulcère induit par ligature du pylore.....	43
III.4.2. Ulcère induit par l'indométacine chez le rat.....	43
III.4.3. Ulcère induit par l'éthanol chez le rat.....	43
III.4.4. Ulcère subaigu chez le rat.....	44
III.4.5. Ulcère induit par ischémie-reperfusion gastrique chez le rat.....	45
III.5. Activité antidiabétique.....	46
III.5.1. Diabète induit par l'alloxane.....	47

III.5.2. Diabète induit par la streptozotocine.....	48
III.5.3. Autres produits diabéto-gènes.....	49
III.6. Activité anti-oxydante.....	49
III.7. Activité antimicrobienne.....	52

ETUDE EXPERIMENTALE

Objectif de l'étude.....	54
---------------------------------	-----------

1^{er} axe : Enquête Ethnobotanique.....	57
---	-----------

1. Site d'étude.....	57
2. Enquête.....	58
3. Cueillette.....	59
4. Résultats de l'enquête.....	59
4.1. Parties de la plante utilisées.....	59
4.2. Affections traitées.....	60
4.3. Formes d'administration.....	61
5. Conclusion.....	62

2^{ème} axe : Etude Phytochimique.....	63
---	-----------

1. Collecte et identification de la plante.....	63
2. Extraction.....	63
2.1. Extrait acétonique.....	63
2.2. Extrait méthanolique.....	65
2.3. Extrait aqueux	65
2.4. Huile essentielle.....	66
3. Détermination de la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux.....	67
3.1. Méthode.....	67
3.1.1. Dosage des polyphénols totaux.....	67
3.1.2. Teneur en flavonoïdes.....	68
3.2. Résultats.....	69
4. Analyse UHPLC/DAD/ESI-MS ²	69
4.1. Méthode.....	69
4.2. Résultats.....	70
4.2.1. Extrait acétonique.....	70
4.2.2. Extrait méthanolique.....	72
4.2.3. Extrait aqueux lyophilisé.....	74
4.3. Discussion.....	77
5. Analyse GCMS.....	79
5.1. Méthode.....	79
5.2. Résultats.....	79
5.3. Discussion.....	82
6. Analyse RMN.....	82
6.1. Méthode.....	82
6.2. Résultats et discussion.....	82

3^{ème} axe : Etudes Toxicologiques	
--	--

Etude de la toxicité aiguë.....	86
1. Méthode.....	86
2. Etude anatomopathologique.....	87

3. Résultats.....	87
4. Discussion.....	102
5. Conclusion	103

Activité cytotoxique.....	104
----------------------------------	-----

1. Méthode.....	104
2. Résultats.....	104
3. Discussion.....	108
4. Conclusion.....	111

4^{ème} axe : Etudes *in vitro* et *in vivo*

Etudes *In vitro*

Activité Antioxydante.....	112
1. Méthode.....	112
2. Résultats.....	113
3. Discussion.....	114
4. Conclusion	114

Activité Antibactérienne.....	115
1. Souches bactériennes.....	115
2. Matériel.....	115
3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque.....	115
3.1. Méthode.....	116
3.2. Résultats.....	117
4. Détermination des CMI et des CMB.....	120
4.1. Détermination de la CMI par la technique de microdilution sur microplaque.....	120
4.1.1. Méthode.....	120
4.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide.....	120
4.2.1. Méthode.....	120
4.3. Résultats.....	121
5. Discussion.....	123
6. Conclusion	125

Etudes *In vivo*

Etude de l'activité anti-inflammatoire.....	131
1. Œdème de la patte induit par la carragénine.....	131
1.1. Méthode.....	131
1.2. Résultats.....	131
2. Modèle de l'œdème de l'oreille induit par le xylène.....	133
2.1. Méthode.....	133
2.2. Résultats.....	133
3. Modèle du granulome induit par les pellets de coton.....	135
3.1. Méthode.....	135
3.2. Résultats.....	135
4. Discussion.....	137
5. Conclusion.....	141

Etude de l'activité antalgique.....	137
1. Test de writhing.....	137
1.1. Méthode.....	137
1.2. Résultats.....	137

2. Test au formaldéhyde.....	139
2.1. Méthode.....	139
2.2. Résultats.....	139
3. Test à la plaque chauffante.....	141
3.1. Méthode.....	141
3.2. Résultats.....	141
4. Discussion.....	143
5. Conclusion.....	147
Etude de l'activité cicatrisante.....	148
1. Méthode.....	148
1.1. Toxicité cutanée.....	148
1.2. Formulation des pommades et crème dermiques.....	148
1.3. Modèle de la plaie par excision.....	149
1.4. Contraction de la plaie.....	149
1.5. Période d'épithélialisation.....	150
1.6. Histopathologie.....	150
2. Résultats.....	150
3. Discussion.....	157
4. Conclusion.....	159
Etude de l'activité antiulcéreuse.....	160
1. Ulcère induit par l'aspirine.....	160
1.1. Méthode.....	160
1.2. Résultats.....	161
2. Ulcère induit par la ligature du pylore.....	163
2.1. Méthode.....	163
2.2. Résultats.....	163
3. Discussion.....	166
4. Conclusion.....	169
Etude des activités antidiabétique et neuroprotectrice.....	170
1. Méthode.....	170
1.1. Induction du diabète et modèle expérimental.....	170
1.2. Paramètres biochimiques.....	171
1.3. Etude anatomopathologique.....	171
1.4. Evaluation de l'effet neuroprotecteur.....	171
1.4.1. Examen histopathologique.....	171
1.4.2. Immunohistochimie.....	172
2. Résultats.....	173
2.1. Suivi des poids.....	173
2.2. Effet sur la glycémie.....	173
2.3. Evaluation du profil lipidique.....	175
2.4. Evaluation des fonctions hépatique et rénale.....	176
2.5. Evaluation de l'effet neuroprotecteur.....	180
2.5.1. Examen histologique.....	180
2.5.2. Immunohistochimie.....	183
3. Discussion.....	186
4. Conclusion.....	191

5^{ème} axe : Cas et Essais Cliniques

Cas Clinique I

Dermatite scrotale à <i>Malassezia pachydermatis</i> chez un Labrador Retriever	192
1. Introduction.....	192
2. Présentation du cas.....	192
3. Examen clinique.....	192
4. Examens complémentaires.....	192
5. Traitement.....	193
6. Conclusion.....	194

Cas Clinique II

Efficacité de la crème à base de l'huile essentielle de <i>Solenostemma argel</i> sur une brûlure de troisième degré chez un chat.....	195
1. Introduction.....	195
2. Présentation du cas.....	195
3. Examen clinique.....	195
4. Examens complémentaires.....	195
5. Traitement.....	196
6. Conclusion.....	197

Cas Clinique III

Efficacité de la crème à base de l'huile essentielle de <i>Solenostemma argel</i> sur des escarres chez un berger allemand atteint de dysplasie bilatérale des hanches.....	198
1. Introduction.....	198
2. Présentation du cas.....	198
3. Examen clinique.....	198
4. Examens complémentaires.....	199
5. Traitement.....	199
6. Conclusion.....	200

Cas Clinique IV

Efficacité de la crème à base d'huile essentielle de <i>Solenostemma argel</i> sur la cicatrisation d'un membre amputé chez une tortue terrestre.....	201
1. Introduction.....	201
2. Présentation du cas.....	201
3. Examen clinique.....	201
4. Examens complémentaires.....	201
5. Traitement.....	201
6. Conclusion.....	203

Cas Clinique V

Efficacité de la crème à base de l'huile essentielle de <i>Solenostemma argel</i> sur une plaie d'automutilation chez un loup doré d'Afrique.....	204
1. Introduction.....	204
2. Présentation du cas.....	204
3. Examen clinique.....	204
4. Examens complémentaires.....	205
5. Traitement.....	205
6. Conclusion.....	205

Cas Clinique VI	
Efficacité de la crème à base d'huile essentielle de <i>Solenostemma argel</i> sur des plaies cutanées chez un couple de faisans	206
1. Introduction	206
2. Présentation du cas	206
3. Examen clinique	206
4. Examens complémentaires	207
5. Traitement	207
6. Conclusion	208
Cas Clinique VII	
Efficacité de la crème à base d'huile essentielle de <i>Solenostemma argel</i> sur des plaies d'été chez des chevaux	209
1. Introduction	209
2. Présentation du cas	209
3. Examen clinique	209
4. Examens complémentaires	210
5. Traitement	210
6. Conclusion	210
Cas Clinique VIII	
Désinfestation par l'extrait aqueux de <i>Solenostemma argel</i> d'un bâtiment d'aquaculture envahi par les puces <i>Ctenocephalides felis</i>	213
1. Introduction	213
2. Présentation du cas	213
3. Examens complémentaires	213
4. Traitement	214
5. Conclusion	214
Essai Clinique I	
Efficacité de l'extrait aqueux de <i>Solenostemma argel</i> sur l'ectoparasitose à <i>Dermanyssus gallinae</i> chez des perruches ondulées (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	215
1. Introduction	215
2. Présentation du cas	215
3. Examen clinique	215
4. Examens complémentaires	216
5. Traitement	217
6. Discussion	218
7. Conclusion	220
Essai clinique II	
Efficacité de l'extrait aqueux de <i>Solenostemma argel</i> sur une ectoparasitose à <i>Lernaea cyprinacea</i> chez des poissons <i>xiphophorus hellerii</i>	221
1. Introduction	221
2. Matériel et méthodes	221
2.1. Echantillonnage	221
2.2. Examen clinique	221
2.3. Examens complémentaires	221
2.4. Analyse des paramètres de l'eau	222
3. Traitement	222

4. Etude anatomopathologique.....	223
5. Résultats.....	223
5.1. Examen clinique.....	223
5.2. Identification de l'ectoparasite.....	223
5.3. Effet sur les paramètres de l'eau.....	224
5.4. Effet sur le parasite <i>Lernaea cyprinacea</i>	225
5.5. Etude anatomopathologique.....	226
6. Discussion.....	227
7. Conclusion.....	230
Discussion générale	231
Conclusion et perspectives	236
Références bibliographiques	
Liste des liens hypertextes	
Annexes	
Productions scientifiques	

Introduction

La phytothérapie est l'une des branches de médecine non conventionnelle la plus utilisée en médecine humaine et vétérinaire. Elle repose sur l'utilisation de plusieurs parties de la plante telles que les fleurs, les feuilles, les racines, les graines et les substances qui en sont extraites pour traiter différentes maladies (**Russo et al., 2009**).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) définit la médecine traditionnelle à base de plantes comme étant la somme totale des connaissances, des compétences et des pratiques basées sur les théories, les croyances et les expériences indigènes de différentes cultures, qu'elles soient explicables ou non, utilisées dans le maintien de la santé ainsi que dans la prévention, le diagnostic, l'amélioration ou le traitement des maladies physiques et mentales (**WHO, 2014**).

La phytothérapie est une pratique de plus en plus utilisée en médecine vétérinaire comme traitement alternatif ou en association avec des traitements conventionnels. Les remèdes phytothérapeutiques utilisés en médecine vétérinaire comprennent des préparations à base de plantes utilisées à des fins thérapeutiques, préventives ou diagnostiques dans le domaine de la santé animale (**Vandhana et al., 2022**). Toutefois, une meilleure connaissance scientifique des propriétés phytochimique, toxique et thérapeutique de ces plantes se révèle indispensable afin de maîtriser leur utilisation en toute sécurité. En effet, peu de données sur l'innocuité et l'efficacité des huiles essentielles, des extraits, des principes actifs et des préparations des plantes sont disponibles (**Fibigr et al., 2018 ; Djebrane et al., 2021**).

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité floristique méditerranéenne, saharienne et paléo-tropicale estimée à plus de 3 000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (**Djebrane et al., 2021**). La majorité de ces espèces sont spontanées, avec un nombre important d'espèces endémiques, avoisinant les 15% (**Ozenda, 1997**), apportant une richesse inestimable à la pharmacopée traditionnelle.

Solenostemma argel (Delile) Haynes (*Asclepiadaceae*) est une espèce tropicale répartie dans le Sahara central, le Sinaï et le désert du sud-est. En Algérie, l'espèce sévit dans le Sahara central, le Tassili n'Ajjer et les monts du Hoggar. La plante est utilisée par la population locale en médecine traditionnelle pour ses propriétés purgative, fébrifuge, antalgique,

cicatrisante, antidiabétique, antirhumatismale, anti-infectieuse et gastro-intestinale **(Benhouhou, 2005).**

C'est dans un cadre de contribution à la valorisation de notre patrimoine naturel et notamment la mise en évidence des propriétés thérapeutiques d'une plante du Sahara algérien que s'inscrit la présente étude. Elle a eu pour principal objectif l'étude de la composition phytochimique, l'innocuité et les propriétés pharmacologiques de trois extraits (acétonique, méthanolique, aqueux) et de l'huile essentielle de *Solenostemma argel* ainsi que leurs applications possibles en médecine vétérinaire.

La présente étude est organisée en deux parties.

□ Une première partie bibliographique qui se décline par 03 chapitres, le premier reprenant une synthèse des données se rapportant à la plante étudiée (origine, classification, utilisations ethnobotaniques, propriétés pharmacologiques, répartition géographique...), le second chapitre décrivant les approches théoriques des processus d'extraction et de screening phytochimique et le troisième chapitre abordant certaines activités pharmacologiques.

□ Une seconde partie expérimentale qui s'articule sur cinq axes :

- ❖ Un premier axe portant sur une enquête ethnobotanique mettant en évidence l'utilisation de *Solenostemma argel* en médecine traditionnelle, en élevage et en usage domestique par les Touaregs.
- ❖ Un deuxième axe décrivant la préparation des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* ainsi que de son huile essentielle et l'analyse de leurs compositions phytochimiques par les techniques LCMS, GCMS et RMN dans le but de connaître leurs principaux constituants et ainsi mieux comprendre leurs propriétés pharmacologiques.
- ❖ Un troisième axe évaluant la toxicité aigüe des extraits et de l'huile essentielle étudiés ainsi que leurs cytotoxicités dans le but de déterminer leur innocuité.
- ❖ Un quatrième axe étudiant les activités antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire, antalgique, cicatrisante, antiulcéreuse, antidiabétique et neuroprotective des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que de l'huile

essentielle de *S.argel* dans le but d'apporter une preuve scientifique de l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle et ainsi enrichir la connaissance de son potentiel bioactif.

- ❖ Un cinquième axe portant sur quelques applications des extraits et de l'huile essentielle de *S.argel* en médecine vétérinaire. Plusieurs cas cliniques sur des animaux sauvages et domestiques y sont présentés.

Le matériel utilisé et les méthodes adoptées lors de cette étude expérimentale y seront détaillés et les résultats obtenus présentés et discutés.

Enfin, une conclusion générale et quelques perspectives clôturent la présente thèse.

Partie Bibliographique

Chapitre I

Monographie de *Solenostemma argel*

Chapitre I. Monographie de la plante étudiée : *Solenostemma argel*

I.1.Présentation de la famille des *Asclepiadaceae*

I.1.1. Généralités

La famille des Asclépiadacées renferme environ 2000 espèces réparties en 300 genres (**Ping-tao et al., 1995; Bosser et al., 2005**) et divisées en six tribus : les Asclépiadées, les Marsdéniiées, les Stapéliées, les Gonolobées, les Sécamonées et les Périplocées (**Ricardou, 1893**).

L'habitat des *Asclepiadaceae* est très étendu, il comprend les régions tropicale et subtropicale particulièrement en Afrique et au sud de l'Amérique latine, avec une représentation modérée dans le nord et le sud de l'Asie (**Ping-tao et al., 1995**).

I.1.2. Classification de la famille des *Asclepiadaceae*

La classification actuelle des angiospermes (APG) place les *Asclepiadaceae* dans la classe des Eudicotylédones, la sous-classe des *Asteridae* et l'ordre des *Gentianales* (**Figure 1**) (**APG IV, 2016**).

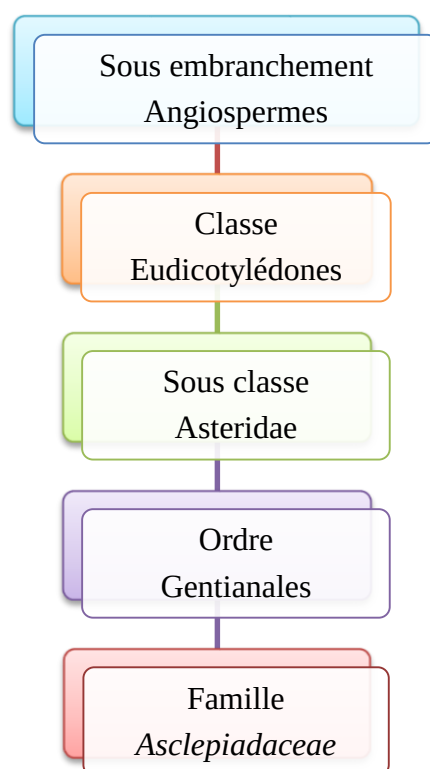


Figure 1 : Classification de la famille des *Asclepiadaceae* (**APG IV, 2016**).

I.1.3. Description botanique

Les plantes qui composent la famille des Asclépiadacées présentent les aspects les plus divers. Quelques fois, ce sont des arbres ; d'autres fois, ce sont des arbustes dressés, des herbes vivaces (**Ricardou, 1893 ; Watson, 1992**), souvent grimpantes et alors volubiles, rhizomateuses, tubéreuses ou radicales, parfois charnues et cactiformes (**Bosser et al., 2005**), souvent à latex blanc, parfois incolore (**Ping-tao et al., 1995**).

Les feuilles de ces plantes présentent des formes assez diverses. Elles sont simples, presque toujours opposées, parfois verticillées ou isolées (**Watson, 1992**). Les inflorescences sont aussi variées, elles peuvent être latérales, axillaires ou terminales, le plus souvent en cymes mais parfois ombelliformes, spiciformes ou même paniculées (**Bosser et al., 2005**).

Les fleurs sont régulières, hermaphrodites, rarement fonctionnellement unisexuées (**Ping-tao et al., 1995**). Le calice est ordinairement composé de cinq sépales libres ou concrescents à leur base. Ces sépales sont généralement constitués par des feuilles vertes terminées en pointe effilée (**Carson, 1847**). La corolle est le plus souvent gamopétale, à tube long ou court, à 5 lobes imbriqués, tordus ou valvaires dans le bouton (**Watson, 1992**).

Les étamines sont alternées avec les pétales. Le gynécée est généralement formé de deux carpelles. Ces derniers sont fermés et libres mais leurs styles se soudent dans la région stigmatifère et se renflent en un corps pentagonal (**Carson, 1847; Bosser et al., 2005**). Chaque loge d'ovaire renferme un grand nombre d'ovules répartis sur plusieurs rangs (**Ping-tao et al., 1995; Bosser et al., 2005**).

Le fruit est composé de deux follicules distincts ; à la maturité il se rompt suivant une ligne longitudinale correspondant aux bords de la feuille carpellaire et se déroule laissant à découvert son placenta chargé de graines. Ces dernières ont presque toujours, autour du hile, à leur sommet, une aigrette formée d'un grand nombre de poils soyeux (**Eglesfeld, 1847 ; Ricardou, 1893**).

I.2. Présentation du genre *Cynanchum* ou *Solenostemma*

Le genre *Solenostemma* ou *Cynanchum* comprend 200 espèces réparties en Afrique, en Amérique du Nord et du Sud, en Asie et en Europe (**Ping-tao et al., 1995**).

Les espèces de ce genre sont des herbes vivaces ou des sous-arbrisseaux volubiles ou érigés (**Ricardou, 1893**), à racines fibreuses, ligneuses ou charnues, à feuilles opposées, cordées, à fleurs régulières. L'inflorescence est extra-axillaire ou occasionnellement terminale (**Ping-tao**

et al., 1995). Les sépales possèdent chacun à leur base une ou plusieurs glandes. La corolle est rotacée, profondément lobée ; la couronne staminale est formée de 10 lanières soudées et opposées sur un double rang, les intérieures ligulées et enroulées au sommet, les extérieures formant des languettes qui dépassent la gorge de la couronne (Eglesfeld, 1847).

Les anthères sont terminées par une membrane et contiennent dans chacune de leurs deux loges une seule pollinie arrondie liée à une seconde par des caudicules et soudées aux angles du disque stigmatifère. Les fruits sont des follicules lisses et contiennent un assez grand nombre de graines aigrettées (Ricardou, 1893; Ping-tao *et al.*, 1995).

I.3. Présentation de l'espèce *Solenostemma argel* (Del.) Hayne

I.3.1. Nomenclature

L'espèce *Solenostemma argel* Hayne est connue sous plusieurs dénominations scientifiques à savoir *Cynanchum argel* Delile, *Cynanchum oleifolium* (Lindley, 1838; Carson, 1847) et *Solenostemma oleifolium* (Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013).

La plante *S. argel* possède plusieurs noms vernaculaires issus de diverses origines. Elle porte le nom de « Arghel » ou « El Hargal » en Arabe (El Hadidi et Fayed, 1995 ; Innocenti *et al.*, 2005 ; Tahir *et al.*, 2005), de « Aghallachem » en Tamâhaq (Sahki, 2004 ; Benhouhou, 2005) et « Arghel » en anglais (Benhouhou, 2005).

I.3.2. Distribution géographique

Solenostemma argel est une plante tropicale qui se propage à travers le Sahara central, dans le Sinaï et le désert du sud-est (Benhouhou, 2005). C'est une espèce saharienne qui se rencontre dans les zones désertiques de l'Algérie, de la Libye et de l'Égypte (Figure 2) (Benhouhou, 2005 ; Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013).

En Algérie, l'espèce est très répandue dans le Sahara central, le Tassili n'Ajjer et les montagnes du Hoggar (Benhouhou, 2005). Elle prospère principalement dans les zones rocailleuses et sablonneuses ainsi que dans les oueds graveleux, entre 500 et 1600 m (Sahki, 2004 ; Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013).



Figure 2 : Distribution géographique de *Solenostemma argel* [1].

I.3.3. Classification

L'espèce *Solenostemma argel* appartient au sous-embranchement des angiospermes, la classe des eudicotylédones, la sous-classe des *Asteridae*, l'ordre des Gentianales, la famille des *Asclepiadaceae* et le genre *Solenostemma* (**Figure 3**).

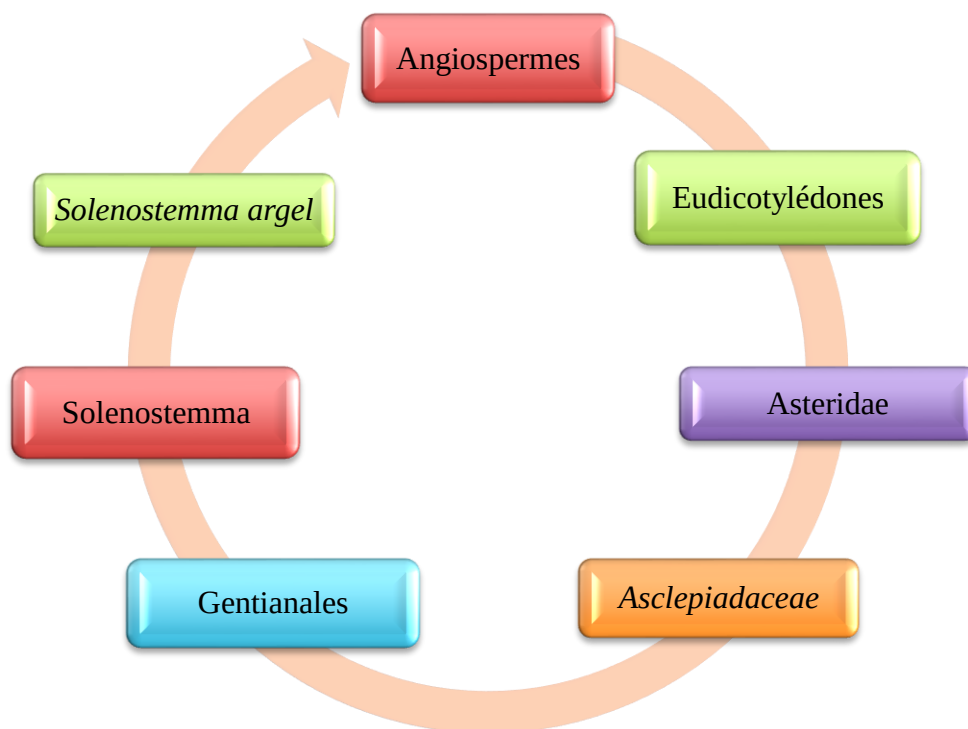


Figure 3 : Lignée taxonomique de *Solenostemma argel* (APG IV, 2016).

I.3.4. Description botanique

S. argel est un arbrisseau buissonnant, vivace, fortement ramifié, charnu, courtement poilu atteignant 60 cm de haut (**Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013**). Les feuilles sont opposées, presque sessiles, ovales lancéolées, d'un vert pâle. Leur nervure médiane est bien prononcée et leur longueur varie de 2 à 4 cm (**Carson, 1847 ; Benchelah et al., 2004**).

Les fleurs sont blanches, très odorantes, nombreuses, disposées en grappes élargies, dichotomes, au sommet des rameaux, dans les aisselles des feuilles (**Figure 4**). Les pédicelles des fleurs sont rapprochés en paquets et les rameaux des grappes sont accompagnés de folioles linéaires (**Engler, 1917 ; Benhouhou, 2005 ; Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013**).



Figure 4 : Arbrisseau et fleur de *Solenostemma argel*.
Photos prises à Abalessa, Tamanrasset (15/01/2015).

Le calice est à cinq divisions linéaires, profondes et longues de 4 mm. La corolle est en roue, à cinq divisions linéaires alternes avec celles du calice. La couronne est à cinq plis et à cinq dents ; ses plis sont opposés aux divisions du calice, et ses dents aux divisions de la corolle (**Carson, 1847 ; Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013**).

Les étamines sont réunies au nombre de cinq, dans le centre de la fleur, en un corps tronqué élevé sur un pédicelle qui est le filet commun des anthères. Ce corps tronqué est à cinq angles, sur chacun desquels se trouve une fissure qui laisse échapper deux masses de pollen oblongues (**Engler, 1917**).

Le tube court de la corolle cache deux ovaires glabres supères, rétrécis en deux styles capillaires qui passent au-dedans du filet commun des anthères, et qui aboutissent au stigmate terminal soudé avec les anthères (**Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013**). La floraison a lieu durant les mois de Mars à Juin.

Le fruit est un follicule solitaire, piriforme, atteignant environ 5 cm de long et 1,5 à 2 cm de large, apex longuement acuminé, violet foncé, marbré ou strié de vert, contenant de nombreuses graines (**Figure 5**). Ces dernières sont étroitement ovoïdes, rainurées d'un côté, à verrues minuscules, brunes, avec une touffe de poils blanchâtres (**Engler, 1917; Sahki, 2004; Benhouhou, 2005; Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013**).



Figure 5 : Fruit de *Solenostemma argel*. Photos prises à Abalessa, Tamanrasset (15/11/2015).

I.3.5. Utilisation ethnobotanique

Dans toute son aire de répartition géographique, la décoction des parties aériennes ou des feuilles de *S. argel* est très prisée comme fébrifuge et purgatif mais aussi pour traiter les coliques, les maux d'estomac, la constipation, la flatulence, les infections des voies urinaires, les douleurs rénales et la toux (**Hocking, 1955 ; Hegazi et al., 1994; Innocenti et al., 2005**).

L'infusion des parties aériennes traite le diabète et la jaunisse, et l'infusion des feuilles et des fleurs est indiquée pour purifier le sang et pour calmer les nerfs (**Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013**). La sève amère de la tige est utilisée comme collyre au cours du rhume, une goutte de cette sève aiderait à dégager les sinus (**Benhouhou, 2005**).

En Libye et en Egypte, la décoction des feuilles est préconisée pour le traitement de la bronchite, la névralgie et la sciatique (**Jabeen et al., 1984**). Dans le Hoggar, les feuilles séchées réduites en poudre sont bouillies dans du lait, adouci avec des dattes ou du sucre. La décoction ainsi préparée se boit pour traiter les rhumatismes, la gonorrhée et l'hémoptysie. Au Liban, les feuilles séchées sont importées, et bouillies dans l'huile d'olive. Ce liquide est utilisé en friction contre les rhumatismes (**Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013**).

La plante est également brûlée et la fumée est inhalée pour traiter la rougeole (**Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013**). Les feuilles fraîches broyées ou les feuilles séchées en poudre sont appliquées sur les plaies et les brûlures pour les désinfecter. La plante s'avère très efficace comme antisyphilitique lorsqu'elle est utilisée pendant une période prolongée allant de 40 à 80 jours (**Boulos, 1983; Hammiche et Maiza, 2006**). Par ailleurs, la plante est également abortive (**Sahki, 2004**).

Dans l'agriculture traditionnelle, de petites touffes de la plante sont introduites dans les canaux d'irrigation, les ruisseaux et les étangs comme insecticide. Les branches sont utilisées pour désinfecter l'eau. Les plantes pilées servent de savon pour le nettoyage du corps et des vêtements (**Benhouhou, 2005 ; Gurib-Fakim et Schmelzer, 2013**).

I.3.6. Métabolites secondaires

Les diverses études phytochimiques de *S. argel* (Hayne) réalisées jusqu'à lors ont livré des résultats contradictoires. **Mahran et al (1967)**, dans leur étude sur les feuilles, les tiges, les fleurs et les fruits de *S. argel*, ont rapporté la présence de b-sitostérol, 7 méthoxy-3,22-dihydrostigmastène, acide éthoxy-vangurolique en plus d'un stéroïde inconnu (**Mahran et al., 1967**).

En revanche l'étude chromatographique de l'extrait alcoolique des feuilles *S. argel*, a signalé la présence de deux substances cristallines nommées argeline et argeloside sans analyse spectrale détaillée ni détermination de leur structure (**Mahran et al., 1969**).

Une étude hongroise a montré que les extraits étheré et chloroformique ne contiennent pas de stéroïdes ni d'alkaloïdes et de flavonoïdes, alors que l'extrait méthanolique était riche en flavonoïdes et en stéroïdes (**Khaled et al., 1974**). Le criblage chimique de feuilles de *S. argel*, a révélé l'existence de lipides, de flavones, d'antocyanosides, de tanins, d'acides aminés, de polyholosides, de polyphénols, de phytostérols et de caroténoïdes (**Younis, 1988**).

L'étude de biosynthèse, sur le calice et les pousses de *S. argel*, a révélé la présence de rutoside, de b-carotène et b-sitostérol (**Amariei et al., 1991**).

Une série d'hétérosides de 14, 15-sécoprégnane, les argélosides, ont été isolés de différentes parties de la plante. A partir des fruits, ont été identifiés les argélosides A-B, à partir des graines les argélosides C-J et à partir des feuilles les argélosides K-O (**Plaza et al., 2003**). De différentes parties de la plante, a également été isolée une série d'hétérosides de 15-Kéto prégnane : les stemmosides A-B de la tige feuillée, les stémmosides C-D du péricarpe et les stémmosides E-K des feuilles (**Hamed, 2001 ; Plaza et al., 2004 ; Plaza et al., 2005**).

A partir des feuilles, le kaempférol-3-O-glucoside et le kaempférol-3-O-rutinoside ont été isolés ainsi que plusieurs dérivés de prégnène, et la solénoside A, un hétéroside de type prégnène (**Innocenti et al., 2005**). Le β -sitostérol et les triterpénoides pentacycliques α -amyrine et β -amyrine ont également été trouvés dans les feuilles (**Hassan et al., 2001**). Par ailleurs, un polyhydroxy-prégnane appelé la stemmine C (**Hamed, 2001**), quatre hétérosides phénoliques acylés (les solargines I-IV) ainsi que d'autres hétérosides flavonoïdes ont été isolés des parties aériennes (**Kamel, 2003**).

Enfin, une étude récente a permis de mettre en évidence trois métabolites majoritaires isolés à partir de l'extrait acétate d'éthyle des feuilles de *S. argel*, à savoir le kaempferol, le kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (astragalin) et le kaempferol-3-O- [α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2) - β -D-glucopyranosyl (**Hassabelrasoul et al., 2021**).

I.3.7. Propriétés pharmacologiques

Certaines activités biologiques des extraits de *S. argel* ont été étudiées. L'activité anti-inflammatoire des extraits méthanolique, étheré, acétonique et chloroformique des feuilles de *S. argel* a été rapportée (**Innocenti et al., 2005**).

Une activité larvicide modérée des extraits aqueux bruts des parties séchées du péricarpe, des fleurs, des racines et de la tige de *S. argel* a également été constatée (**EL-Kamali, 2001**).

Plusieurs argélosides et stemmosides isolés à partir de *S. argel* ont montré une activité antiproliférative avec effet dose-dépendant dans différents modèles de tumeurs humaines et murines (**Plaza et al., 2005**).

D'autres propriétés biologiques ont été rapportées, notamment les effets anti-obésité (**El-Shikh et al., 2019**), anti-hépatotoxique (**Ahmed, 2017**), anti-arthritique (**El-Shiekh et al., 2021**) et inhibiteur de la cholinestérase (**Demmak et al., 2019**).

S. argel contient une gamme de composés bioactifs intéressants. Néanmoins des études plus poussées doivent être menées pour évaluer complètement les usages médicaux traditionnels rapportés sous leurs différentes formes.

Chapitre II

Extraction et screening phytochimique

Chapitre II : Extraction et screening phytochimique

La procédure de préparation des plantes médicinales à des fins expérimentales implique la collecte appropriée de la plante, l'authentification par un botaniste expérimenté, un séchage et un broyage adéquats. Suivent ensuite les étapes d'extraction, de fractionnement et d'isolement du composé bioactif, le cas échéant.

II.1. Extraits de plantes médicinales

Les méthodes d'extraction varient dans la durée et la période d'extraction, du type de solvant utilisé, de la température, de la taille des particules des parties de la plante et du rapport solvant/échantillon (**Das et al., 2010**).

II.1.1. Choix du solvant

La détermination réussie d'un composé biologiquement actif à partir de matériel végétal dépend en grande partie du type de solvant utilisé dans la procédure d'extraction (**Das et al, 2010**). En suivant le principe des « extraits similaires », il est souvent possible d'adapter le choix du solvant pour maximiser les rendements des composés d'intérêt, tout en minimisant l'extraction des composés indésirables (**Jones et Kinghorn, 2006**).

Ainsi, les facteurs devant être pris en compte lors du choix d'un solvant ou d'un système de solvants pour l'extraction de matériel végétal sont présentés dans la **Figure 6** (**Das et al., 2010 ; Tiwari et al., 2011**).



Figure 6 : Facteurs influençant le choix du solvant d'extraction (**Tiwari et al., 2011**)

II.1.2. Méthodes d'extraction

1.2.1. Macération

La macération est une méthode courante pour extraire de petites quantités de matériel végétal en laboratoire. Au cours de ce procédé, la matière végétale est grossièrement réduite en poudre et maintenue en contact avec le solvant dans un récipient fermé pendant une durée de 72 h sous agitation fréquente jusqu'à dissolution des matières solubles (**Handa, 2008 ; Tiwari et al., 2011**). Le mélange est ensuite filtré, le marc est pressé et les liquides combinés sont clarifiés par filtration ou décantation après repos (**Handa, 2008**).

La sonication de l'échantillon en macération est parfois utilisée pour réduire le temps nécessaire à une extraction approfondie (**Jones et Kinghorn, 2006**). Cette méthode d'extraction est adaptée pour l'extraction des composés thermolabiles (**Tiwari et al., 2011**) mais présente les inconvénients d'une consommation élevée de solvant, des temps d'extraction longs et de faibles rendements d'extraction (**Bucar et al., 2013**).

II.1.2.2. Infusion

L'infusion est un processus d'extraction au cours duquel la poudre de plante finement broyée est macérée dans de l'eau froide ou bouillante pendant une courte période (**Handa, 2008; Tiwari et al., 2011**). Cette méthode convient à l'extraction de constituants bioactifs facilement solubles. De plus, il s'agit d'une méthode appropriée pour la préparation d'extrait frais avant utilisation. Le rapport solvant/échantillon est généralement de 4:1 ou 16:1 selon l'utilisation prévue (**Abubakar et Haque, 2020**).

II.1.2.3. Décoction

La décoction est un processus impliquant une extraction continue à chaud en utilisant un volume d'eau spécifiée comme solvant. La matière végétale séchée, broyée et réduite en poudre est mise au contact de l'eau et l'ensemble est porté à ébullition sous agitation pendant 15 min. L'extrait est par la suite refroidi et filtré. Cette procédure convient à l'extraction de constituants hydrosolubles et thermostables (**Handa, 2008; Tiwari et al., 2011; Abubakar et Haque, 2020**). Le rapport de départ de la poudre végétale à l'eau est généralement de 4:1 ou 16:1 (**Handa, 2008**).

II.1.2.4. Percolation

La percolation est une méthode d'extraction efficace, adaptée aux échantillons de taille moyenne à grande (**Jones et Kinghorn, 2006**). C'est le procédé le plus fréquemment utilisé pour extraire les principes actifs dans la préparation des teintures et des extraits fluides (**Handa, 2008**). Le dispositif utilisé dans ce processus est appelé percolateur. Il s'agit d'un récipient en verre en forme de cône étroit avec une ouverture aux deux extrémités (**Abubakar et Haque, 2020**). La matière végétale pré-trempée dans le solvant d'extraction est placée dans le percolateur, additionnée de solvant et macérée pendant 24 h. Des quantités adéquates de solvant sont ajoutées au fur et à mesure afin de maintenir le matériel végétal couvert. Par la suite, une évacuation constamment contrôlée de l'extrait via une vanne permet de réguler le débit afin de s'assurer que le solvant sortant est presque saturé de soluté. De plus, du solvant supplémentaire est ajouté au besoin, jusqu'à ce que le percolat mesure environ les trois quarts du volume requis du produit fini (**Jones et Kinghorn, 2006; Handa, 2008; Bucar et al., 2013**). Enfin, bien qu'en principe plus efficace et plus économique en solvant que la macération, la percolation n'est généralement pas pratiquée pour de petites quantités de matériel végétal ou pour un grand nombre d'échantillons (**Jones et Kinghorn, 2006**).

II.1.2.5. Extraction par Soxhlet

L'extraction par soxhlet est une méthode pratique pour l'extraction de volumes faibles à modérés de matériel végétal (**Jones et Kinghorn, 2006**). Ce processus est également connu sous le nom d'extraction à chaud continue et peut convenir aux matières végétales partiellement solubles dans le solvant choisi et à celles contenant des impuretés insolubles (**Abubakar et Haque, 2020**). L'avantage de ce procédé est que l'extraction a lieu dans un système fermé dans lequel le solvant est continuellement recyclé (**Figure 7**), ainsi, de grandes quantités d'extraits peuvent être extraites avec une quantité minimale de solvant (**Jones et Kinghorn, 2006; Handa, 2008**). Cela entraîne une économie considérable en termes de temps et d'énergie (**Handa, 2008**). Cependant, l'extraction par soxhlet présente des inconvénients tels que l'exposition à des solvants organiques liquides dangereux et inflammables, avec des émissions toxiques potentielles lors de l'extraction (**Azwanida 2015**). Aussi, cette méthode ne peut pas être utilisée pour les composés thermolabiles car un chauffage prolongé peut entraîner une dégradation des composés (**Tiwari et al., 2011**).

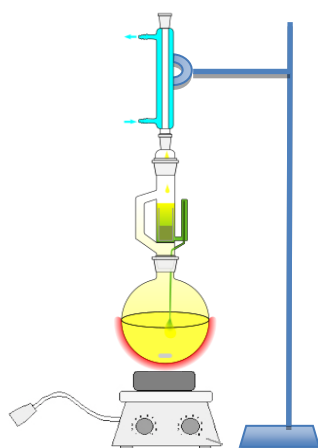


Figure 7 : Schéma du dispositif d'extraction par soxhlet [2]

II.1.2.6. Extraction par ultrasons

Ce processus implique l'application d'énergie sonore à une fréquence très élevée allant de 20 kHz à 2000 kHz; cela augmente la perméabilité des parois cellulaires et produit de la cavitation (**Handa, 2008**). Les propriétés physiques et chimiques des matériaux soumis aux ultrasons sont altérées, ce qui perturbe la paroi cellulaire végétale, facilitant ainsi la libération des composés et améliorant le transport de masse des solvants dans les cellules végétales (**Azwanida, 2015**).

Les avantages de l'extraction assistée par ultrasons sont principalement dus à la réduction du temps d'extraction et la quantité de solvant utilisée, ainsi qu'à la maximisation du rendement (**Abubakar et**

Haque, 2020). Par ailleurs, l'inconvénient de la procédure est l'effet délétère occasionnel mais connu de l'énergie des ultrasons (plus de 20 kHz) sur les constituants actifs des plantes médicinales par la formation de radicaux libres et par conséquent des changements indésirables dans les molécules de médicament (**Handa, 2008**).

II.1.2.7. Extraction assistée par micro-ondes

C'est l'une des procédures d'extraction avancées dans la préparation des plantes médicinales. La technique utilise un mécanisme de rotation dipolaire et de transfert ionique par déplacement d'ions chargés présents dans le solvant et l'échantillon (**Abubakar et Haque, 2020**). Les méthodes d'extraction établies emploient soit des micro-ondes diffusées dans des systèmes fermés, soit des micro-ondes focalisées dans des systèmes ouverts (**Bucar et al., 2013**).

Cette technique implique l'utilisation de rayonnements micro-ondes pour bombarder un objet, qui peut absorber l'énergie électromagnétique et la convertir en chaleur. Par la suite, la chaleur produite facilite le mouvement du solvant dans la matrice du matériel végétal (**Abubakar et Haque, 2020**).

Par rapport aux méthodes conventionnelles d'extraction par solvant, la technologie l'extraction assistée par micro-ondes offre une combinaison d'avantages notamment : une pureté accrue des extraits bruts, une stabilité améliorée des composés, une réduction des coûts de traitement et de la consommation d'énergie et de solvants (**Doughari, 2012**).

II.1.2.8. Extraction par fluide supercritique (SFE)

L'extraction de liquide supercritique (SFE) est une méthode alternative de préparation d'échantillons avec des objectifs généraux de réduction de l'utilisation de solvants organiques et d'augmentation du débit d'échantillons (**Handa, 2008**). Il s'agit du système d'extraction le plus avancé technologiquement. En effet, l'extraction de fluide super critique implique l'utilisation de gaz, généralement du CO₂, et sa compression en un liquide dense. Ce liquide est ensuite pompé à travers un cylindre contenant la matière à extraire. De là, le liquide chargé d'extrait est pompé dans une chambre de séparation où l'extrait est séparé du gaz et le gaz est récupéré pour être réutilisé (**Doughari, 2012**).

Les avantages de cette méthode sont la polyvalence qu'il offre pour identifier les constituants qui seront extraits d'un matériau donné et le fait que le produit final ne contient pratiquement aucun résidu de solvant (le CO₂ s'évapore complètement) (**Handa, 2008 ; Doughari, 2012**). Un inconvénient majeur de cette méthode est le coût initial très élevé de l'équipement (**Azwanida, 2015**).

II.1.3. Métabolites secondaires des extraits de plantes médicinales

Les plantes médicinales synthétisent de nombreux métabolites secondaires, qui les aident à survivre et à se reproduire.

II.1.3.1. Phénols

Les composants phénoliques sont largement présents chez les plantes et sont synthétisés en réponse à certaines situations stressantes telles que les radiations UV, les blessures et les infections.

La grande catégorie des composés phénoliques est divisée en phénols simples et en polyphénols, basée exclusivement sur le nombre de sous-unités phénoliques présentes (**Goleniowski *et al.*, 2013**) (**Figure 8**).

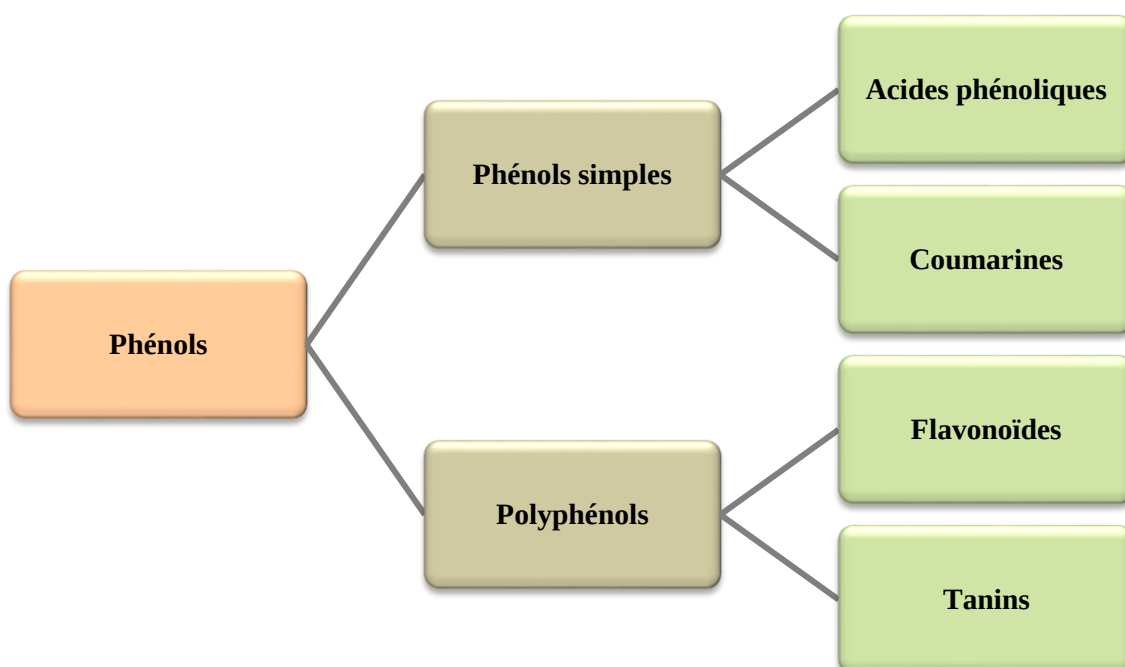


Figure 8 : Représentation schématique des groupes de composés phénoliques chez les plantes (**Goleniowski *et al.*, 2013**)

Grace à leurs propriétés pharmacologique et biologique, les composés phénoliques ont généré un intérêt considérable, notamment pour leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires, anti-mutagéniques et anti-carcinogéniques (**Maas *et al.*, 1991**).

II.1.3.1.1. Phénols simples

Le groupe des phénols simples est représenté par les acides phénoliques et les coumarines.

II.1.3.1.1.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont une sous classe des phénols, présents dans les plantes comestibles sous forme d'ester ou de glycosides conjugués avec d'autres composants tels que les flavonoïdes, les stérols, les alcools et les glucosides (**Goleniowski et al., 2013**). Les acides phénoliques ont connu un engouement scientifique considérable en raison de leurs propriétés antioxydante, anti-inflammatoire, immunorégulatrice, antimicrobienne, cardioprotectrice et antidiabétique (**Rashmi et Negri, 2020**). Les dérivés des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques sont les plus importants représentants des acides phénoliques.

II.1.3.1.1.2. Coumarines

Les coumarines sont une famille de benzopyrones largement répandues dans la nature (**Matos et al., 2014**). Chez les plantes, les coumarines sont retrouvées dans les racines, les tiges, les fleurs, les fruits et les feuilles, même si leurs concentrations sont plus élevées dans les fruits et les fleurs (**Hussein et al., 2017**).

Les composés coumariniques sont une classe de lactones structurellement construites par un cycle benzène fusionné à un cycle α -pyrone. Il existe différentes classifications pour les dérivés de la coumarine. Généralement, ils peuvent être classés chimiquement selon les noyaux les plus courants en : coumarines simples, furocoumarines, dihydrofurocoumarines, pyranocoumarines (linéaires et angulaires), phénylcoumarines et biscoumarines (**Jain et Joshi, 2012; Matos et al., 2014; Hussein et al., 2017**). L'umbelliférone, l'esculétine et la scopolétine sont les coumarines les plus répandues dans la nature (**Jain et Joshi, 2012**) (**Figure 9**).

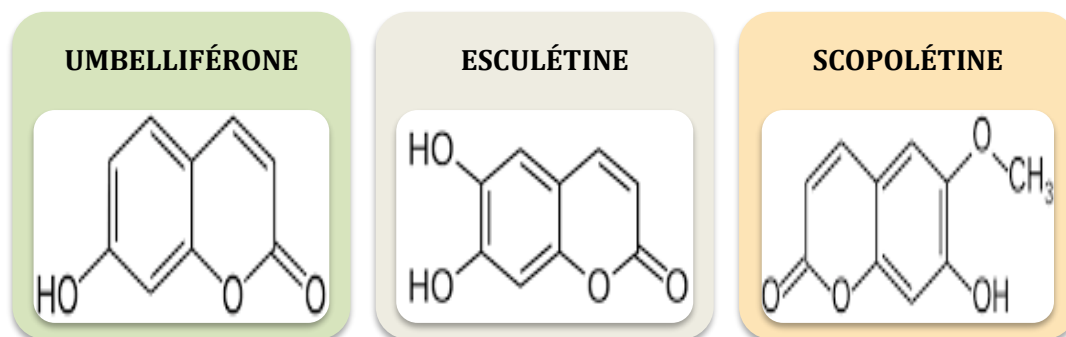


Figure 9 : Structures chimiques de certaines coumarines (**Jain et Joshi, 2012**)

De nombreuses activités pharmacologiques ont été attribuées aux coumarines telles que les activités anticoagulantes, hypotensives, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, anticonvulsives, anti-adipogéniques, anti-hyper-glycémiantes, antioxydantes et neuroprotectrices (Matos *et al.*, 2014).

II.1.3.1.2. Polyphénols

II.1.3.1.2.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un groupe important de polyphénols largement distribués dans la flore végétale. Structuellement, ils sont constitués de plus d'un cycle benzénique dans sa structure (Doughari, 2012).

Les flavonoïdes sont caractérisés par des structures phénoliques variables. Ils peuvent être divisés en une variété de classes telles que les flavones (apigénine, lutéoline), les flavonols (quercétine, kaempférol, myricétine), les flavanones (hespérétine, naringénine), les flavanonols (taxifoline), les isoflavones (genistéine, daidzéine) et les flavan-3-ols (catechine, Epicatechine) (Kumar et Pandey, 2013). Ils peuvent se présenter aussi bien sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides (Pinheiro et Justino, 2012) (Figure 10).

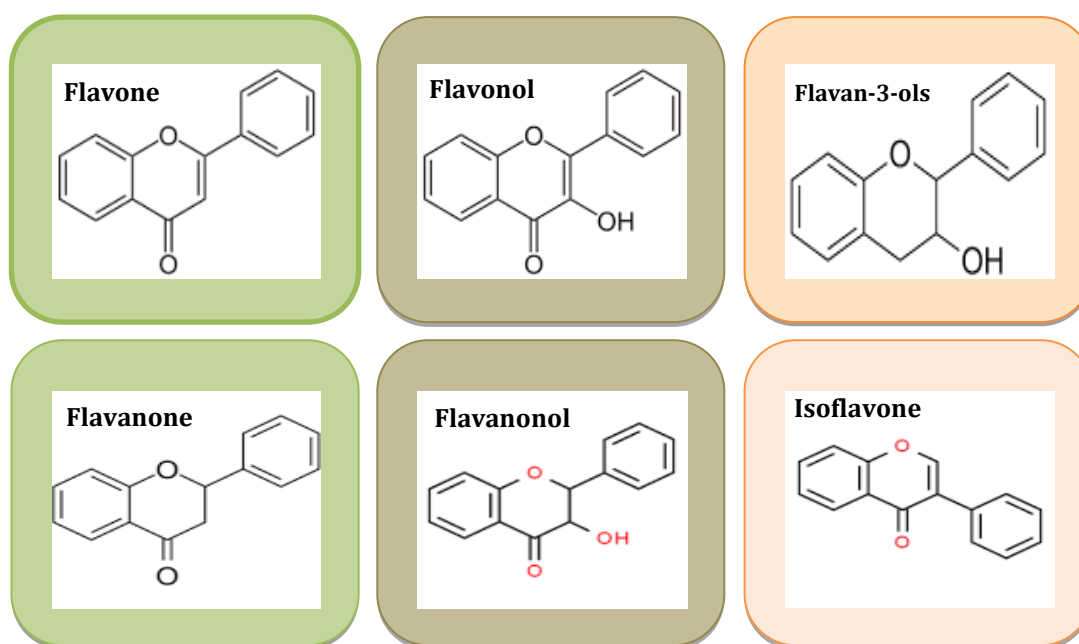


Figure 10 : Structures chimiques de base des différentes classes de Flavonoïdes (Kumar et Pandey, 2013)

Par ailleurs, les flavonoïdes possèdent plusieurs propriétés biologiques, notamment, des effets antioxydants, hépato-protecteurs, anti-inflammatoires, anti-cancéreux et antimicrobiens (Kumar et Pandey, 2013).

II.1.3.1.2.2. Tanins

Le nom "tanin" couvre une large gamme de composés naturels qui ne sont pas nécessairement apparentés sur le plan structurel et qui sont largement distribués dans tout le règne végétal (**Russel, 1935**).

L'observation que certains tanins pouvaient être fractionnés et que d'autres non, a conduit à leur classification en tanins hydrolysables et tanins condensés. Les tanins condensés sont représentés par les proanthocyanidines oligomères et polymères, alors que les tanins hydrolysables incluent à la fois les gallotanins et les ellagitannins (**Kashiwada et al., 1992**).

En médecine, les extraits de plantes contenant des tanins sont utilisés comme astringents, diurétiques, anti-diarrhéiques, anti-cancéreux, anti-inflammatoires, antiseptiques et hémostatiques (**Khanbabaee et Ree, 2001**).

II.1.3.2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes forment un groupe de molécules de structures diverses caractérisées pour la plus part par des effets pharmacologiques puissants (**Wink, 2010**). Ils représentent une vaste classe de produits naturels d'approximativement 12000 composants (**Sireesha et al., 2019**).

Les alcaloïdes sont classés en deux catégories hétérocycliques et non hétérocycliques (**Bribi et al., 2017**). Leur structure chimique est complexe, composée d'atome d'azote (**Figure 11**), ce dernier est une part du système hétérocyclique et participe de manière significative à l'activité pharmacologique (**Sireesha et al., 2019**).

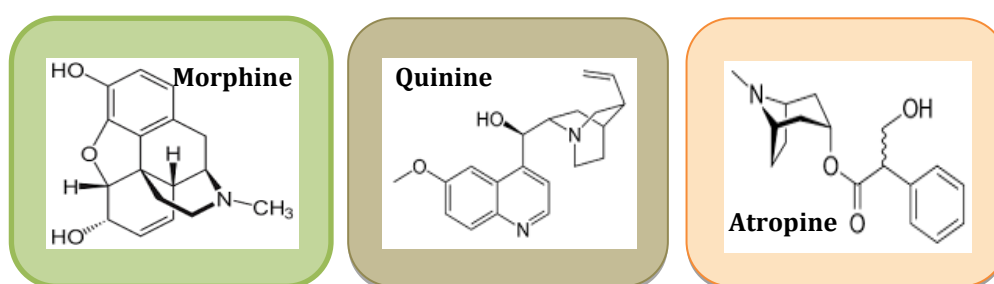


Figure 11 : Exemples d'alcaloïdes utilisés dans le domaine médical (**Sireesha et al., 2019**)

Les alcaloïdes sont caractérisés par de nombreuses activités biologiques, notamment, myorelaxante, anticancéreuse, antimicrobienne, anti-oxydante, insecticide et analgésique (**Sireesha et al., 2019**). De plus, ils sont utilisés comme stimulateurs sympathiques agissant directement sur les récepteurs α et β , offrant ainsi une activité antipsychotique et anti-hypertensive (**Debnath et al., 2018**).

II.1.3.3. Saponosides

Les saponines sont des glycosides largement répandus dans le règne végétal comprenant un groupe diversifié de composés caractérisés par leur structure contenant un aglycone stéroïde ou triterpénoïde et une ou plusieurs chaînes de sucre (Güçlü-Üstündağ et Mazza, 2007) (Figure 12). Cette caractéristique structurelle fait que les saponines sont des composés tensioactifs aux propriétés détergentes, émulsifiantes et moussantes (Wang *et al.*, 2005).

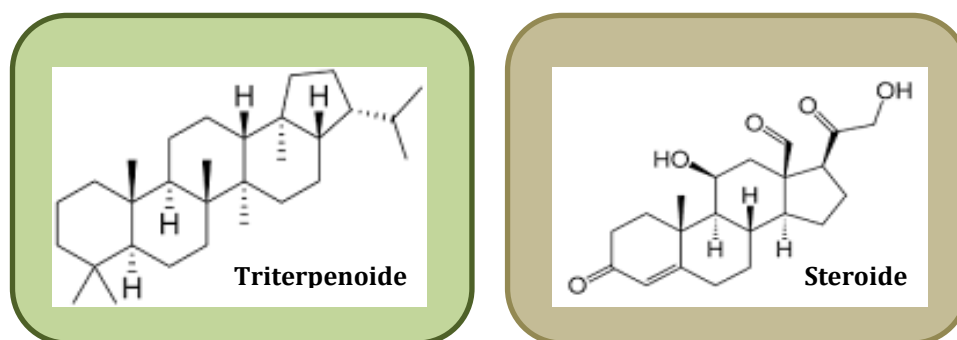


Figure 12 : Structure de base des saponines: triterpénoïde et stéroïde (Güçlü-Üstündağ et Mazza, 2007)

Les saponines possèdent une large gamme d'activités biologiques notamment les activités hémolytique, insecticide, hépaproctrice, hypocholestérolémiante, hypoglycémique, anti-inflammatoire, analgésique, antimicrobienne, antiparasitaire et antimutagène (Francis *et al.*, 2002 ; El Aziz, 2019). Leurs propriétés physicochimiques et biologiques sont de plus en plus exploitées dans les secteurs alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

II.2. Extraits de plantes aromatiques

Parmi les types d'isolats volatils obtenus à partir des plantes aromatiques, les principaux sont la concrète, l'absolu et l'huile essentielle.

II.2.1. Concrète

Il s'agit d'un extrait de fleurs fraîches, d'herbes, de feuilles et de sommités florifères de plantes obtenu par l'utilisation d'un solvant hydrocarboné tel que le butane, le pentane, l'hexane et l'éther de pétrole. L'extrait ainsi obtenu est riche en matériaux solubles dans les hydrocarbures et dépourvu de composants solubles dans l'eau. Il s'agit généralement d'un matériau cireux, semi-solide, de couleur foncée, exempt du solvant d'origine (Handa, 2008).

II.2.2. Absolue

L'absolue est une forme transformée de concrète utilisée en parfumerie. Il s'agit d'un concentré volatil extrait à l'alcool.

II.2.3. Huile essentielle

Les huiles essentielles sont des composés volatils, naturels, complexes caractérisés par une forte odeur et sont formés par les plantes aromatiques comme métabolites secondaires **(Bakkali et al., 2008)**. Elles sont également nommées huiles volatiles ou huiles éthérées du fait de leur tendance à s'évaporer lorsqu'elles sont exposées à l'air, même dans les conditions ambiantes **(Doughari, 2012)**.

Les huiles essentielles sont extraites de diverses plantes aromatiques généralement localisées dans les pays tempérés à chauds comme les pays méditerranéens et tropicaux où elles représentent une part importante de la pharmacopée traditionnelle **(Bakkali et al., 2008)**. Elles sont obtenues à partir de diverses parties des plantes aromatiques, notamment les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines, les bourgeons, les rhizomes, les racines et les écorces **(Shaaban et al., 2012)**.

Les huiles essentielles et certains de leurs composants sont utilisés dans plusieurs domaines notamment en cosmétique, en dentisterie, en agriculture comme conservateurs et additifs alimentaires et en médecine alternative **(Bakkali et al., 2008)**. En effet, les huiles essentielles ont reçu beaucoup d'attention en tant que sources possibles de médecine alternative sûres et naturelles, car elles sont connues pour posséder diverses activités médicinales, notamment anti-oxydante, anti-inflammatoire, analgésique, sédatrice, antimicrobienne, antivirale et anti-cancérigène **(Shaaban et al., 2012)**.

Ainsi, elles pourraient constituer des alternatives ou des compléments efficaces aux composés synthétiques de l'industrie chimique, sans montrer les mêmes effets indésirables **(Carson et Riley, 2003)**.

II.2.3.1. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

II.2.3.1.1. Hydrodistillation

Il existe trois types d'hydrodistillation pour isoler les huiles essentielles des matières végétales : la distillation à l'eau, la distillation à l'eau et à la vapeur et la distillation directe à la vapeur.

Ces trois méthodes sont soumises aux mêmes considérations théoriques qui traitent de la distillation des systèmes à deux phases. Les différences résident principalement dans les méthodes de manipulation du matériau **(Handa, 2008)**.

II.2.3.1.1.1. Distillation à l'eau

L'hydrodistillation est le procédé le plus simple et le plus ancien disponible pour obtenir des huiles essentielles à partir de plantes (**Tandon, 2008; Rassem et al., 2016**). Dans cette méthode, l'eau est portée à ébullition et l'huile essentielle est amenée au condenseur avec la vapeur qui se forme (**Tandon, 2008**). L'appareil recommandé pour les distillations à l'eau est le système Clevenger (**Figure 13**) (**Handa, 2008**). La quantité d'huile produite va dépendre de la durée de la distillation, de la température, de la pression et du type de matériel végétal (**Stratakos et Koidis, 2016**).

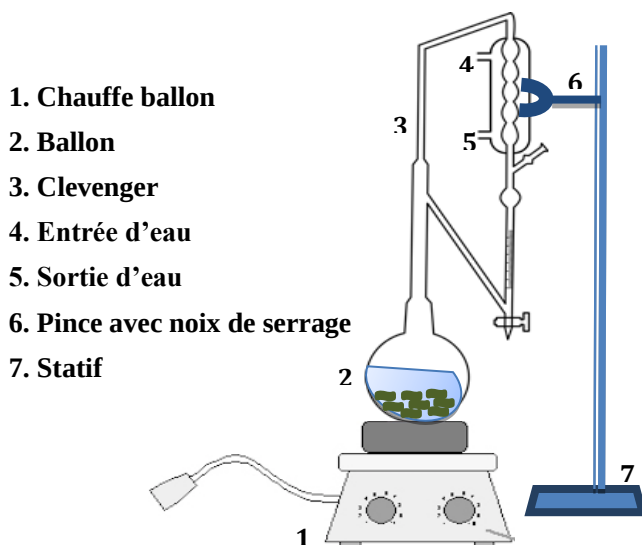


Figure 13 : Schéma du dispositif d'extraction par hydro-distillation "système Clevenger" (**Rassem et al., 2016**)

La distillation à l'eau possède un avantage distinct, c'est-à-dire qu'elle permet de traiter des matières finement pulvérisées. D'autres avantages pratiques de l'hydrodistillation sont que les alambics sont peu coûteux, faciles à construire et adaptés aux opérations sur le terrain (**Handa, 2008**). Cependant, un inconvénient majeur de cette technique est que les huiles essentielles sont exposées à de l'eau bouillante pendant de longues périodes, la formation d'artefacts est un problème possible en raison de la température élevée. Cela peut entraîner des différences dans la composition des huiles volatiles extraites (**Stratakos et Koidis, 2016**).

II.2.3.1.1.2. Distillation à l'eau et à la vapeur

Le procédé de la distillation à l'eau et à la vapeur a été développé afin de palier à certains des inconvénients de la distillation à l'eau. En effet, certaines modifications ont été apportées aux unités de distillation en introduisant une grille perforée dans l'alambic, pour soutenir la matière végétale et éviter son contact direct avec la source de chaleur. Ainsi, lorsque le niveau d'eau est maintenu sous la grille, l'huile essentielle est distillée par la vapeur montante de l'eau bouillante (**Tandon, 2008**).

Comparativement à la distillation à l'eau, ce procédé présente de meilleurs avantages, notamment, un rendement en huile plus élevé, des composants moins sensibles à l'hydrolyse et la polymérisation, une qualité d'huile plus reproductible et une économie en énergie.

Par ailleurs, un inconvénient majeur de ce type de distillation consiste à rendre la matière végétale assez humide. Cela ralentit la distillation car la vapeur doit vaporiser l'eau pour lui permettre de se condenser plus haut dans l'alambic (**Handa, 2008**).

II.2.3.1.1.3. Distillation directe à la vapeur

La distillation directe à la vapeur est le processus de distillation de la matière végétale avec de la vapeur générée à l'extérieur du réservoir dans un générateur de vapeur ou une chaudière. Comme dans la distillation à l'eau et à la vapeur, la matière végétale est supportée sur une grille perforée au-dessus de l'entrée de vapeur (**Handa, 2008; Tandon, 2008**). Le principe de cette technique est que la pression de la vapeur combinée est égale à la pression ambiante à environ 100 °C afin que les composants volatils avec des points d'ébullition allant de 150 à 300 °C puissent être évaporés à une température proche de celle de l'eau (**Rassem et al., 2016**).

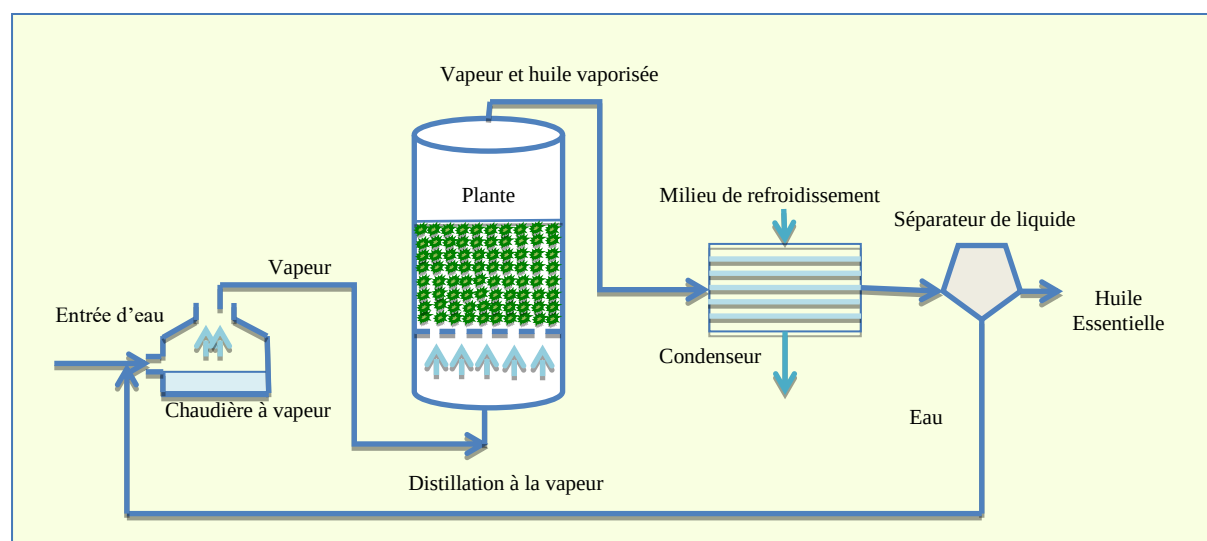


Figure 14 : Schéma d'une unité de distillation à la vapeur pour l'extraction des huiles essentielles (**Stratakos et Koidis, 2016**)

Un des avantages de la distillation à la vapeur est que l'utilisation de la vapeur à haute pression dans les unités modernes de distillation à la vapeur, permet une distillation beaucoup plus rapide et complète des huiles essentielles sans décomposition thermique de leurs constituants (**Handa, 2008; Tandon, 2008**). Aussi, Les coûts de combustible sont généralement inférieurs dans les unités de

distillation à la vapeur modernes en raison de l'efficacité thermique plus élevée à laquelle fonctionnent la plupart des chaudières (**Tandon, 2008**).

II.2.3.1.2. Extraction par expression

L'expression ou pressage à froid est la méthode d'extraction la plus ancienne et est utilisée presque exclusivement pour la production d'huiles essentielles d'agrumes (**Handa, 2008**). Cette méthode fait référence à tout processus physique au cours duquel les glandes à huile essentielle de la peau et des cuticules sont brisées afin de permettre à l'huile d'être libérée. Ce processus aboutit à la production d'une émulsion aqueuse, qui est ensuite centrifugée pour séparer l'huile essentielle (**Stratakos et Koidis, 2016**).

La raison de l'extraction des huiles essentielles d'écorces d'agrumes à basse température et à basse pression par des méthodes mécaniques est l'instabilité thermique des aldéhydes présents (**Stratakos et Koidis, 2016 ; Rassem et al., 2016**). Ce processus est utilisé pour la plupart des huiles de support et de nombreuses huiles essentielles et garantit la pureté de l'huile obtenue à 100 % tout en conservant toutes les propriétés de la plante (**Rassem et al., 2016**).

II.2.3.1.3. Extraction par solvant

L'extraction par solvant, également connue sous le nom d'extraction ou de séparation liquide-liquide, est une méthode pour séparer un composé en fonction de la solubilité de ses parties. Cela se fait en utilisant deux liquides qui ne se mélangent pas (**Rassem et al., 2016**). Les solvants couramment utilisés pour l'extraction sont l'alcool, l'hexane, l'éthanol, l'éther de pétrole et le méthanol. Le principal avantage de l'extraction par rapport à la distillation est qu'une température plus basse est utilisée pendant le processus, réduisant ainsi le risque de changements chimiques dus aux températures élevées, qui sont utilisées pendant la distillation (**Stratakos et Koidis, 2016**).

Bien que la méthode soit relativement simple et assez efficace, elle souffre d'inconvénients tels qu'un long temps d'extraction, une consommation de solvant relativement élevée et une reproductibilité souvent insatisfaisante (**Dawidowicz et al., 2008**). L'huile essentielle produite contiendra une petite quantité de solvant sous forme de résidu et son utilisation pour des applications alimentaires n'est donc pas possible. Cependant, si le solvant utilisé est de l'alcool, il est sans danger pour la consommation et considéré comme « de qualité alimentaire ». Cette méthode est couramment utilisée par l'industrie de la parfumerie (**Stratakos et Koidis, 2016**).

II.2.3.1.4. Extraction par enfleurage

L'enfleurage est une méthode d'extraction conventionnelle qui remonte à l'Antiquité, destinée principalement à l'extraction d'huiles essentielles de fleurs (**Stratakos et Koidis, 2016**). En effet, certaines fleurs odorantes de haute qualité telles que le jasmin, la tubéreuse et le gardénia donnent de petites quantités d'huile et ne peuvent donc pas être distillées par hydro-distillation (**Singh, 2008**). De plus, ces fleurs, même après la cueillette, continuent leurs activités physiologiques de développement et de parfumage, raison pour laquelle leurs huiles sont extraites à froid par des graisses (**Handa, 2008**). Effectivement, la graisse possède un haut pouvoir d'absorption des huiles volatiles et mise en contact avec des fleurs odorantes, elle absorbe leur parfum (**Singh, 2008**).

De nouvelles fleurs remplacent les anciennes et le processus est répété pendant de très longues périodes jusqu'à ce que la saturation de la graisse soit atteinte. Par la suite, la graisse est collectée et extraite avec de l'alcool (**Stratakos et Koidis, 2016**). Ce principe appliqué méthodiquement à grande échelle constitue l'enfleurage (**Singh, 2008**).

II.2.3.1.5. Hydrodistillation assistée par micro-ondes

La capacité du rayonnement micro-ondes à chauffer efficacement un matériau solide peut également être utilisée pour obtenir des huiles essentielles (**Pangarkar, 2008**). En effet, l'hydrodistillation assistée par micro-ondes est une technique d'hydrodistillation avancée utilisant un four à micro-ondes dans le processus d'extraction.

Cette technique est caractérisée par une capacité de performance d'extraction élevée et rapide avec une consommation de solvant moindre et une protection offerte aux constituants thermolabiles. Cela a rendu le processus d'extraction moins énergivore et plus durable (**Rassem et al., 2016; Stratakos et Koidis, 2016**), minimisant ainsi l'impact environnemental en émettant moins de CO₂ dans l'atmosphère (**Rassem et al., 2016**).

II.2.3.2. Composants chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels très complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composants à des concentrations assez différentes (**Bakkali et al., 2008**). Deux groupes d'origine biosynthétique distincte composent les huiles essentielles. Un groupe principal composé de dérivés terpénoïdes et un autre groupe constitué de dérivés phénylpropanoïdes, tous caractérisés par un faible poids moléculaire (**Fokou et al., 2020**).

II.2.3.2.1. Terpènes

Les terpènes forment des classes structurellement et fonctionnellement différentes. Ils sont fabriqués à partir de combinaisons de plusieurs unités à base de 5 carbones (C5) appelées isoprène (**Bakkali et al., 2008**). Les terpènes sont les constituants les plus courants des huiles essentielles, ils représentent 80% de leur composition (**Fokou et al., 2020**). Ils sont fabriqués à partir d'unités d'isoprène.

Les huiles essentielles se composent principalement de monoterpènes (C10) et de sesquiterpènes (C15) mais aussi d'hémiterpènes (C5), de diterpènes (C20), de triterpènes (C30) et de tétraterpènes (C40) à très faible concentration avec leurs dérivés oxygénés, respectivement. Cette diversité chimique et structurelle est principalement due aux variations du nombre de répétitions d'unités d'isoprène, les réactions de cyclisation et les réarrangements (**Stephane et Jules, 2020**) (Figure 15).

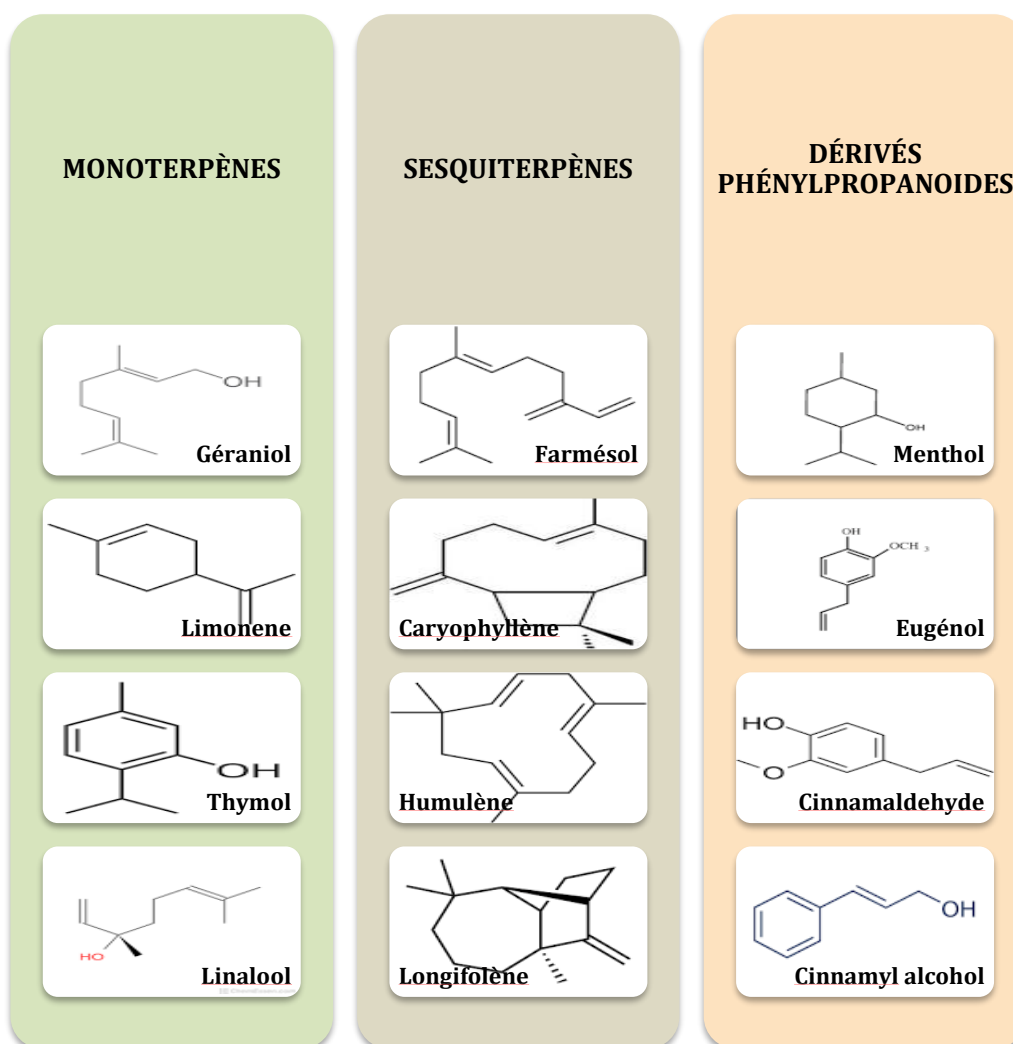


Figure 15 : Structures chimiques de certains composants des huiles essentielles (**Stephane et Jules, 2020**)

II.2.3.2.1.1. Monoterpènes

Les monoterpènes sont formés à partir du couplage de deux unités isoprène (C10). Ce sont les molécules les plus représentatives constituant 90% des huiles essentielles et permettant une grande variété de structures. Ils se composent de différentes fonctions notamment les fonctions carbures, alcools, aldéhydes, cétone, ester, éthers, peroxydes et phénols (**Bakkali et al., 2008; Stephane et Jules, 2020**).

De nombreux monoterpènes possèdent des propriétés pharmacologiques notamment antimicrobiennes, anti-inflammatoires, antioxydantes, antiprurigineuses, hypotensives et analgésiques (**Zielin'ska-Blajet et Feder-Kubis, 2020**).

II.2.3.2.1.2. Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont d'autres composants majeurs des huiles essentielles et sont moins volatils que les monoterpènes (**Stephane et Jules, 2020**). Les sesquiterpènes sont formés de l'assemblage de trois unités isoprène (C15). L'extension de la chaîne augmente le nombre de cyclisations ce qui permet une grande variété de structures. La structure et la fonction des sesquiterpènes sont similaires à celles des monoterpènes (**Bakkali et al., 2008**).

II.2.3.2.2. Composés aromatiques

Dérivés du phénylpropane, les composés aromatiques sont moins fréquents que les terpènes. Cependant, leur présence confère aux huiles essentielles une saveur, une odeur et un piquant significatifs (**Fokou et al., 2020**). Les voies de biosynthèse des terpènes et des dérivés phénylpropaniques sont généralement séparées chez les plantes mais peuvent coexister chez certaines, une voie majeure prenant le relais (**Bakkali et al., 2008**).

II.3. Méthodes d'analyses

II.3.1. CCM / HPTLC

La chromatographie sur couche mince (CCM) implique l'utilisation d'un mécanisme d'adsorption pour séparer un composé d'un mélange. La séparation est basée sur l'interaction entre les composés dans un mélange et une phase stationnaire. Ce procédé est applicable dans la séparation de composés à faible poids moléculaire (**Ingle et al., 2017**). Au cours de cette technique, la phase stationnaire est généralement constituée de silice. L'extrait est appliqué dans la partie inférieure de la plaque puis cette dernière est soigneusement insérée dans la chambre de séparation contenant la phase mobile.

Les composés contenus dans le mélange migreront à différentes positions sur la plaque en fonction de leur affinité différentielle pour la phase solide et la phase mobile. Chaque composé séparé est identifié en calculant son facteur de retardement (**Abubakar et Haque, 2022**).

La CCM ou sa version plus sophistiquée la chromatographie en couche mince haute performance (HPTLC) sont des méthodes d'analyse utilisées pour la comparaison rapide d'une série d'échantillons avec du matériel de référence. La HPTLC peut être considérée comme une méthode établie avec une application dans le contrôle de la qualité conforme aux bonnes pratiques de fabrication des médicaments à base de plantes et de leurs préparations. Le couplage CCM/HPTLC avec la spectrométrie de masse a considérablement augmenté les informations spectrales sur des composés sélectionnés (**Bucar et al., 2013**).

II.3.2. Chromatographie liquide haute performance (CHLP ou HPLC)

Cette technique utilise le mécanisme d'adsorption pour obtenir une séparation efficace. Elle permet en effet l'utilisation de billes plus petites limitant les phénomènes de diffusion et donc donnant lieu à des pics plus fins que la chromatographie liquide classique. Mais l'utilisation de billes plus petites nécessite l'utilisation de pression plus grande pour faire passer le liquide à travers la colonne.

Elle convient à la séparation des composés organiques et inorganiques. La phase mobile est un solvant approprié, tandis que la phase stationnaire est constituée de particules solides étroitement liées. La séparation est initiée via l'interaction des composés dans le mélange avec la particule solide de la phase stationnaire (**Sasidharan et al., 2011 ; Ingle et al., 2017**).

L'appareil se compose d'un réservoir de solvant, d'un injecteur d'échantillon, d'une pompe à pression, d'un tube HPLC et d'une diode détecteur (**Abubakar et Haque, 2022**) (**Figure16**).

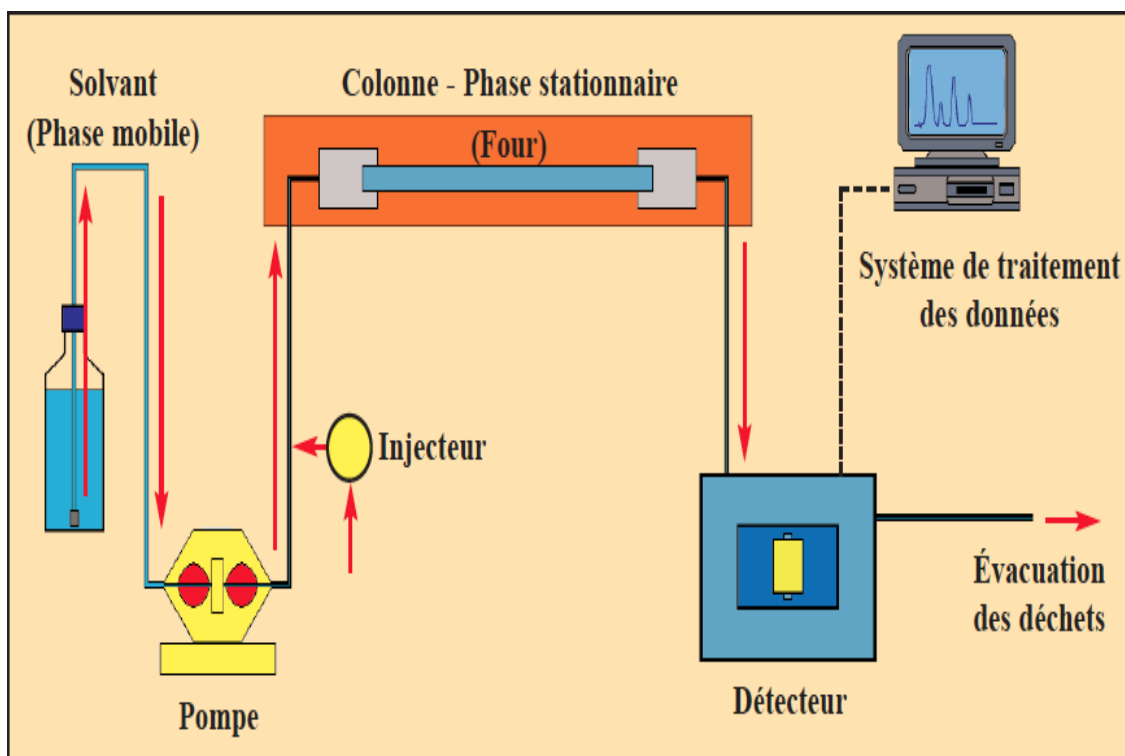


Figure 16 : Composition d'un appareil de CHPL (CIBAC, 2009)

La CHPL peut être couplée avec différentes méthodes de détection spectroscopique comme PDA, MS ou RMN offrant ainsi plusieurs façons d'identifier le matériel végétal (Bucar *et al.*, 2013).

II.3.3. Chromatographie liquide couplée à la spectroscopie de masse (LC-MS)

Dans l'industrie pharmaceutique, la LC-MS est devenue une méthode de choix à de nombreuses étapes du développement de médicaments. Les avancées récentes incluent les techniques d'électro-pulvérisation, de thermo-pulvérisation et d'ionisation par pulvérisation ionique qui offrent des avantages uniques de sensibilité et de spécificité de détection élevées (Doughari, 2012).

II.3.4. Chromatographie Liquide couplée à la Résonance Magnétique Nucléaire (LC-NMR)

La combinaison de la technique de séparation chromatographique avec la spectroscopie RMN est l'une des méthodes les plus puissantes et les plus rapides pour la séparation et l'élucidation structurelle de composés et de mélanges inconnus, en particulier pour l'élucidation de la structure des substances sensibles à la lumière et à l'oxygène (Doughari, 2012).

La technique LC-NMR en ligne permet l'enregistrement continu des changements de temps tels qu'ils apparaissent dans le cycle chromatographique. L'acquisition et le traitement automatisés des données en LC-NMR améliorent la vitesse et la sensibilité de la détection (**Daffre et al., 2008**).

II.3.5. Chromatographie gazeuse (GC)

Le mécanisme de la chromatographie gazeuse repose sur la partition. Deux solvants non miscibles sont utilisés : l'un sous forme gazeuse (phase mobile) et l'autre sous forme liquide adsorbé à la surface d'un solide inerte pour servir de phase stationnaire (**Doughari, 2012**). Les avantages de cette méthode incluent la capacité de séparer le matériel végétal contaminé par des pesticides volatils (**Abubakar et Haque, 2022**). Par ailleurs, la chromatographie gazeuse bidimensionnelle (GC-GC) et la GC multidimensionnelle (MDGC) en combinaison avec l'analyse de données multi-variées (MVDA), ont rendu l'analyse des composés volatils encore plus informative (**Bucar et al., 2013**).

II.3.6. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS)

L'équipement de chromatographie en phase gazeuse peut être directement interfacé avec un spectromètre de masse à balayage rapide de différents types. Le débit de la colonne capillaire est généralement suffisamment faible pour que la sortie de la colonne puisse être introduite directement dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse (**Doughari, 2012**).

Le détecteur de masse le plus simple en GC est le « Ion Trap Detector (ITD) ». Dans cet instrument, des ions sont créés à partir de l'échantillon élué par impact d'électrons ou ionisation chimique et stockés dans un champ de radiofréquence ; les ions piégés sont ensuite éjectés de la zone de stockage vers un détecteur multiplicateur d'électrons. L'éjection est commandée de sorte qu'un balayage sur la base du rapport masse sur charge est possible (**Philipson, 2007**).

II.3.7. Chromatographie en fluide supercritique

La chromatographie en phase liquide supercritique (SFC) est un hybride de la chromatographie en phase gazeuse et liquide qui combine certaines des meilleures caractéristiques de chacune. Cette technique est un type important de chromatographie sur colonne qui commence à trouver une utilisation dans de nombreux laboratoires industriels, réglementaires et universitaires. La SFC est importante car elle permet la séparation et la détermination d'un groupe de composés qui ne sont pas facilement manipulés par la chromatographie en phase gazeuse ou liquide. La SFC a été appliquée à

une grande variété de matériaux, y compris les produits naturels, les médicaments, les aliments et les pesticides (**Doughari, 2012**).

II.3.8. Méthodes spectroscopiques

Plusieurs méthodes ont été utilisées dans l'identification de composés à partir d'extraits de plantes médicinales. Il comprenait la détection du groupe fonctionnel, la présence de plusieurs liaisons et anneaux, l'arrangement de l'hydrogène et du carbone ainsi que l'élucidation structurale complète (**Doughari, 2012; Banu et Cathrine, 2015**). Les techniques utilisées comprennent la spectroscopie de masse (MS), la spectroscopie ultraviolette (UV), la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectroscopie infrarouge (IR).

II.3.8.1. Spectroscopie de masse (MS)

Cette méthode est utile pour l'identification de composés sur la base de la structure chimique et du poids moléculaire. L'objectif est de séquencer et d'identifier un composé inconnu dans un mélange (**MVS et al., 2015**). Le processus commence par le bombardement d'une molécule organique avec un électron et sa conversion en ions chargés très énergétiques.

Le signal est d'abord détecté en utilisant une énergie d'ionisation électronique de 70 eV ; de plus, les spectres d'échantillon sont détectés et enregistrés sous forme de pic de pourcentage. Les composés sont identifiés en fonction de leur masse moléculaire relative et de leur poids moléculaire (**Ingle et al., 2017**).

II.3.8.2. Spectroscopie ultraviolette (UV)

Cette méthode est adaptée à l'analyse qualitative et quantitative des composés présents dans l'extrait de plante. Divers métabolites secondaires tels que les phénols, les anthocyanes, les tanins et les colorants polymères ont pu être détectés à certaines fréquences. Le contenu phénolique total et d'autres métabolites secondaires peuvent être établis à l'aide de cette technique.

Des fréquences spécifiques ont été utilisées pour identifier les flavonoïdes (320 nm), les composés phénoliques (280 nm), les anthocyanes (520 nm) et les acides phénoliques (360 nm) (**Banu et Cathrine, 2015; Altemimi et al., 2017**).

II.3.8.3. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Cette technique accorde plus d'attention aux propriétés physiques de la molécule bioactive telles que le nombre et le réseau d'atomes de carbone, la présence d'isotopes de carbone, d'atomes d'hydrogène et de protons. Elle décrit également comment les atomes sont disposés dans une molécule (**MVS et al., 2015; Banu et Cathrine, 2015; Altemimi et al., 2017**).

II.3.8.4. Spectroscopie infrarouge (IR)

Cette méthode tente d'évaluer les groupes fonctionnels présents dans un composé. La connaissance du groupe fonctionnel permet de définir les propriétés physiques et chimiques d'un composé donné. De plus, des liaisons simples, doubles et multiples sont identifiées par ce processus (**Sasidharan et al., 2011; Ingle et al., 2017**).

La technique consiste à faire passer un composé organique à travers un rayonnement infrarouge, qui est absorbé à certaines fréquences. Les échantillons liquides sont identifiés à l'aide de plaques de chlorure de sodium, tandis que les échantillons solides sont déterminés à l'aide de bromure de potassium broyé et comprimé en une fine pastille. Le résultat est enregistré sous la forme d'un spectre qui est un pourcentage de transmission. Enfin, les spectres sont analysés ; les pics obtenus à un certain nombre d'ondes sont comparés à la référence standard (**Sasidharan et al., 2011; Banu et Cathrine, 2015; Altemimi et al., 2017**).

Chapitre III

Activités pharmacologiques

Chapitre III : Activités pharmacologiques

Ce chapitre a pour principal objectif la présentation théorique des différentes méthodes d'évaluation des activités pharmacologiques abordées dans cette thèse.

III.1. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation peut être considérée comme la première réponse d'un tissu vivant à une blessure et peut apparaître suite à une infection, une agression par des facteurs physiques (traumatisme, rayonnement, température), ou des substances chimiques (produits chimiques irritants et corrosifs) ainsi que des réactions de nécrose tissulaire et d'hypersensibilité. Elle se caractérise didactiquement par le quintet suivant : rougeur (rubor), chaleur (calor), œdème (tumeur), douleur (dolor) et dysfonctionnement des organes concernés (functio laesa) (**Silva, 2016**).

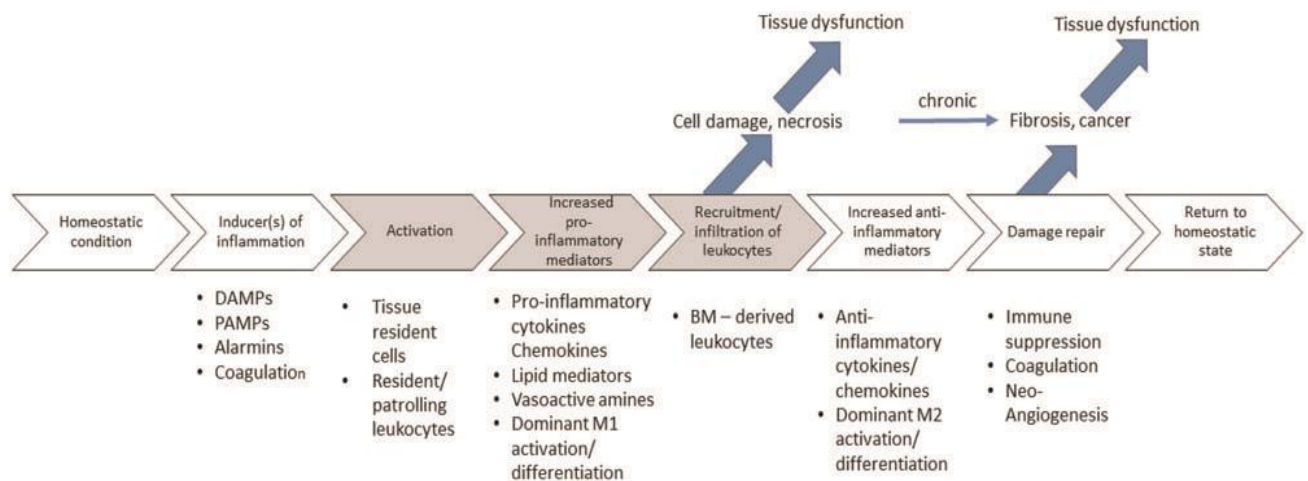
Selon sa durée, l'inflammation est qualifiée d'aiguë ou de chronique. L'inflammation aiguë est transitoire et programmée pour se résoudre. L'échec de cette résolution entraîne l'installation d'une inflammation chronique qui sera à l'origine d'une fibrose et l'apparition d'une pathologie (**Oronsky et al., 2022**). Le passage à la chronicité se produit lorsque la réponse inflammatoire est inégale pour éliminer les stimuli antigéniques, tels que les corps étrangers ou les micro-organismes, ou d'autres déclencheurs inflammatoires, notamment les cristaux d'urate, les cristaux de cholestérol, la silice et la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Pahwa et al., 2022**).

Bien que les processus de réponse inflammatoire dépendent de la nature précise du stimulus initial et de sa localisation dans le corps, ils partagent tous un mécanisme commun, qui peut être résumé comme suit (**Chen et al., 2018**) (**Figure 17**) :

- 1) les récepteurs de surface cellulaire reconnaissent les stimuli nuisibles dont les plus importants sont les récepteurs Toll Like (TLR) ;
- 2) les voies inflammatoires sont activées notamment les voies NF- κ B, MAPK et JAK-STAT ;
- 3) les marqueurs inflammatoires telles que les cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et les protéines et les enzymes inflammatoires (CRP, haptoglobine, fibrinogène) sont libérés suite à l'activation des cellules inflammatoires (macrophages, adipocytes)

par les stimuli. Ces molécules servent de bio-marqueurs pour le diagnostic, le pronostic et la prise de décision thérapeutique des maladies (**Goldstein et al., 2009**) ;

4) les cellules inflammatoires sont recrutées suite au déclenchement de la cascade inflammatoire. Les premières cellules attirées vers un site de blessure sont les neutrophiles, suivies des monocytes, des lymphocytes (des cellules NK, des cellules T et des cellules B) et des mastocytes (**Stramer et al., 2007**).



DAMP : modèles moléculaires associés aux dommages ; **PAMP** : modèles moléculaires associés aux agents pathogènes ; **BM** : moelle osseuse

Figure 17 : Différentes étapes de la réponse inflammatoire d'un tissu.
(**Villeneuve et al., 2018**).

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire peut être réalisée par des méthodes *in vivo* et *in vitro*.

III.1.1. Tests *In vivo*

Le processus inflammatoire implique une série d'événements qui peuvent être provoqués par de nombreux stimuli. Les réponses inflammatoires se produisent en trois phases distinctes, chacune apparemment médiée par des mécanismes différents :

- ❖ **Une phase aiguë** : caractérisée par une vasodilatation locale et une augmentation de la perméabilité capillaire ;
- ❖ **Une phase subaiguë** : caractérisée par une infiltration de leucocytes et de cellules phagocytaires ;
- ❖ **Une phase proliférative chronique** : caractérisée par la dégénérescence et la fibrose tissulaires (**Vino, 2014**).

En fonction de ces phases, des tests pharmacologiques ont été développés. Les tests les plus utilisés sont représentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Tests pharmacologiques pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *In vivo*

Phases aiguë et subaiguë	Phase proliférative chronique
- Érythème UV chez le cobaye - Perméabilité vasculaire - Œdème de l'oreille induit par l'oxazolone chez la souris - Œdème de l'oreille à l'huile de Croton chez les rats et les souris - Œdème de la patte chez le rat - Tests de pleurésie	- Granulome induit par les pellets de coton - Granulome en bâtonnet de verre - Granulome spongieux

(Vino, 2014).

III.1.2. Tests *In vitro*

Un ensemble de substances physiologiques telles que l'histamine, la bradykinine, la sérotonine, la substance P, les prostaglandines, les leucotriènes et les cytokines sont impliquées dans le processus d'inflammation et de réparation. Leur découverte a permis le développement de nombreux tests pour la détermination des mécanismes d'action *In vitro* (Vino, 2014).

Les tests les plus utilisés sont le test d'inhibition des cyclooxygénases 1 et 2, les tests d'inhibitions des cytokines (IL1, IL6, IL8, TNF alpha), le test de liaison au récepteur H3 de la substance P, le test de liaison au récepteur de la bradykinine et le test d'inhibition du facteur nucléaire kB, [1]
[SÉP]

III.2. Activité antalgique

La distinction entre la nociception et la douleur est importante à considérer lors de l'utilisation de modèles murins précliniques. La nociception correspond aux mécanismes par lesquels les stimuli nocifs sont détectés par le système nerveux périphérique, codés, transférés et traités inconsciemment par le système nerveux. La détection est assurée par des transducteurs moléculaires spécifiques portés par des neurones nociceptifs dont les corps cellulaires sont

regroupés dans la racine dorsale ou les ganglions trigéminaux. Ce signal afférent est ensuite traité par des réseaux complexes au sein de la corne dorsale de la moelle épinière (**Todd, 2010**) ou son équivalent dans le tronc cérébral. Ce traitement est sous l'influence à la fois d'informations sensorielles et de contrôles descendants du cerveau. La nociception comprend également une partie du traitement de l'information par le cerveau ainsi que certaines réponses réflexes pour protéger l'organisme (**Rhudy et al., 2005; Barrot, 2012**) (**Figure 18**).

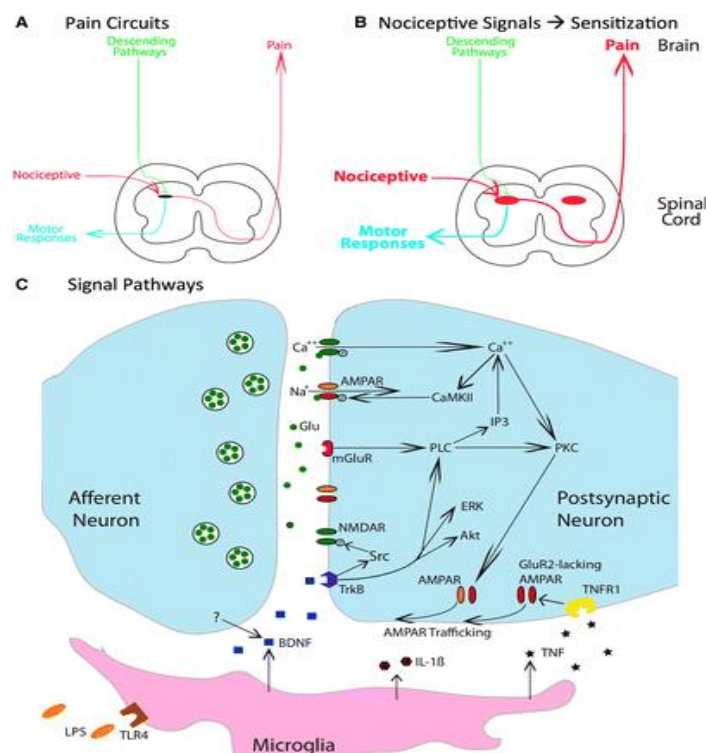


Figure 18 : Schéma simplifié des principales voies nociceptives (**Grau et al., 2017**).

En revanche, la douleur est une expérience consciente qui nécessite le traitement cortical et l'interprétation aversive de l'information nociceptive (**Benarroch, 2006**). C'est une expérience subjective et complexe avec une composante affective nécessaire, accompagnée de composantes sensorielles discriminatives, autonomes et cognitives (**Barrot, 2012**). Bien que la nociception et la douleur semblent étroitement liées, les preuves cliniques ont également prouvé qu'elles peuvent être dissociées l'une de l'autre (**Barrot, 2012 ; Mischkowski et al., 2018**).

La douleur est évaluée et quantifiée par l'expression verbale chez l'être humain, ce qui n'est pas possible chez les rongeurs.

Ainsi, ce que l'on appelle communément les « tests de douleur » chez les animaux de laboratoire sont en réalité des tests nociceptifs, et la mesure préclinique de la douleur elle-même reste

encore un défi dans le domaine (**Barrot, 2012**). Il existe plusieurs tests *In vivo* d'évaluation de la nociception périphérique et centrale, les plus utilisés sont représentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Tests de nociception *in vivo*

Tests	Type	Stimuli	Espèces animales	Nociception
Test à la plaque chauffante	Thermique	Température fixe	Rat, souris	Centrale
Test à la plaque froide	Thermique	Température fixe	Rat, souris	Centrale
Tail flick test	Thermique	Température fixe	Rat, souris	Centrale
Writhing test	Chimique	Injection intrapéritonéale	Souris	Périphérique
Plantar® test	Thermique	Température fixe	Rat, souris	Centrale
Test au formaldéhyde	Chimique	Injection dans la patte	Rat, souris	Centrale/ périphérique
Test de Von Frey	Mécanique	Pressions multiples	Rat, souris	Périphérique
Test de Randall-Selitto	Mécanique	Pression	Rat	Périphérique
Strain gauges test	Mécanique	Pression	Rat	Périphérique

(Randall et Selitto, 1957; Koster *et al.*, 1959; Dubuisson et Dennis, 1977; Kitchen et Crawder, 1985; Barrot, 2012)

Par ailleurs, l'activité antalgique centrale peut être évaluée par certaines méthodes *In vitro*, notamment, le test de liaison au récepteur de la nociceptine (**Varani *et al.*, 1999**), le test de liaison au H³-naloxone (**Pert et Snyder, 1974**), le test de liaison au récepteur de la vanilloïde (capsaïcine) (**Acs *et al.*, 1994**) et le test de liaison aux récepteurs des cannabinoïdes (**Compton *et al.*, 1994**).

III.3. Activité cicatrisante

Une plaie peut être définie comme une rupture aiguë ou chronique de la continuité cellulaire et anatomique ou fonctionnelle des tissus vivants provoquée par des facteurs internes ou externes (Teixeira *et al.*, 2020). La cicatrisation est un processus naturel dynamique de restauration de l'intégrité des tissus dermiques et épidermiques qui se déroule en trois phases interdépendantes et imbriquées : la phase inflammatoire, la phase proliférative et la phase de remodelage ou d'épithélialisation (Gushiken *et al.*, 2016) (Figure 19).

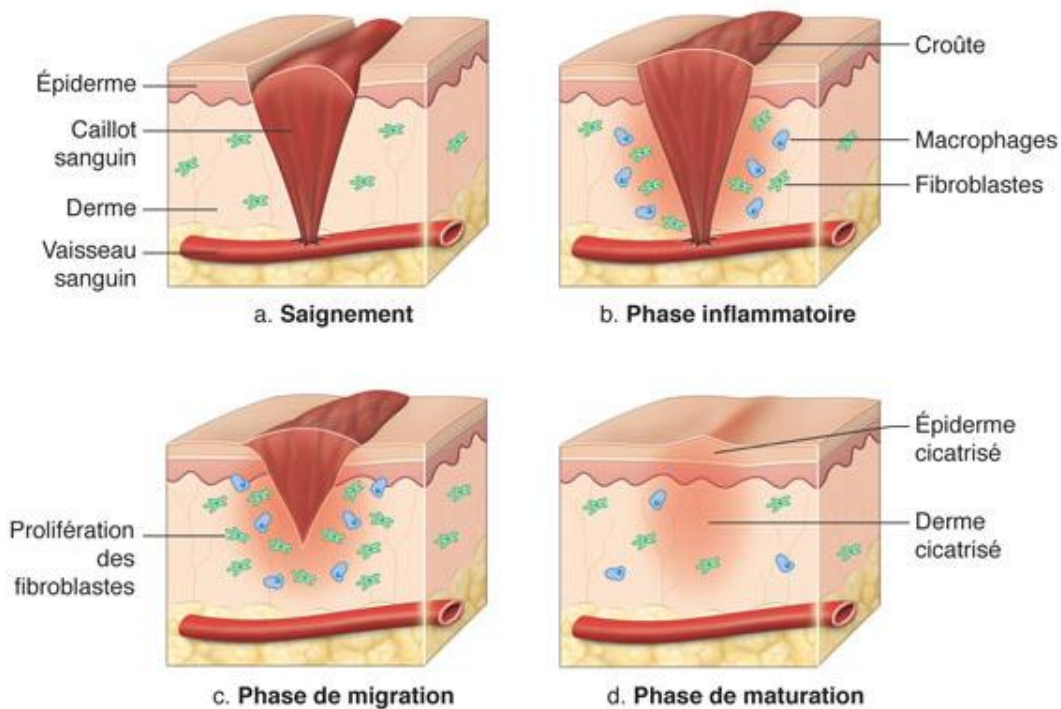


Figure 19 : Phases de la cicatrisation (Brigas-Dos Santos *et al.*, 2018)

Les plaies représentent l'un des premiers motifs de consultation en médecine vétérinaire. De ce fait, le choix du traitement est primordial afin d'éviter les complications et d'obtenir une cicatrisation rapide et de qualité.

Les produits naturels sont largement utilisés dans la cicatrisation des plaies, en particulier les huiles essentielles qui ont montré des résultats prometteurs dans les études précliniques sur la cicatrisation des plaies (Gushiken *et al.*, 2016). Ces substances naturelles pourraient constituer une alternative intéressante pour le traitement des plaies chez les animaux.

Les modèles les plus largement utilisés pour évaluer la cicatrisation sont les modèles des plaies incisionnelles et excisionnelles sur les rongeurs. Ces plaies sont dites de pleine épaisseur et impliquent l'incision ou l'excision de l'épiderme, du derme, des tissus sous-cutanés et de la

couche musculaire sous-jacente trouvée chez les rongeurs le panniculus carnosus **(Tomlinson et Ferguson, 2003 ; Birch *et al.*, 2005)**.

Les plaies cutanées incisionnelles et excisionnelles permettent une évaluation qualitative et quantitative des traitements à toutes les étapes de la réparation de la plaie, y compris la formation de tissu de granulation, la résolution de la réponse inflammatoire, le taux de réépithélialisation, la mesure de la résistance de la plaie et l'évaluation de la cicatrisation **(Tomlinson et Ferguson, 2003)**.

À l'heure actuelle, il n'y a pas de modèles *In vivo* de plaies chroniques non cicatrisantes qui peuvent imiter de manière adéquate les changements cellulaires et moléculaires observés dans certaines situations cliniques telles que l'ulcère veineux **(Morris *et al.*, 1997)**. De plus, il n'existe pas de modèles rongeurs de cicatrices chéloïdes ou hypertrophiques **(Leenen *et al.*, 1994)**.

III.4. Activité antiulcéreuse

L'ulcère peptique est une maladie gastro-intestinale multifactorielle fréquente chez certaines espèces animales, notamment les espèces sportives. La formation d'ulcère gastrique passe par plusieurs stades de développement de la muqueuse gastrique, à savoir l'inflammation, l'érosion puis l'ulcère proprement dit **(Figure 20)**. Les ulcères gastriques sont généralement causés par une perturbation de l'équilibre entre les facteurs agressifs (pepsine et acide chlorhydrique) et les facteurs défensifs de la muqueuse gastrique, tels que le flux sanguin, le mucus et la sécrétion de bicarbonate **(Souza *et al.*, 2011)**.

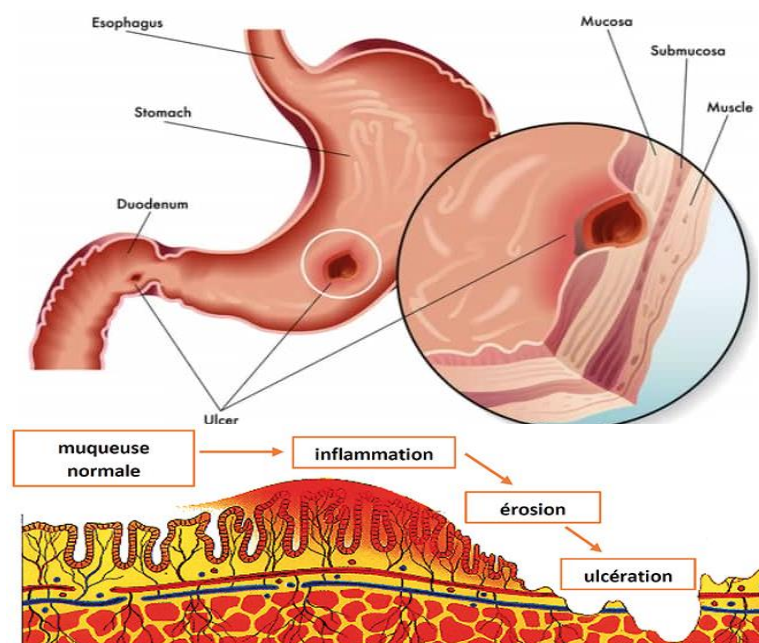


Figure 20 : Stades de développement de l'ulcère gastrique [2], [3].

Plusieurs facteurs peuvent favoriser ce déséquilibre ; parmi lesquels un traitement prolongé avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), le stress, l'intensité de l'activité physique, une gestion alimentaire inappropriée, une prédisposition génétique, une maladie systémique, des infections à *Helicobacter pylori* et *Helicobacter equorum* et l'ingestion de toxiques (**Martinez et Silveira, 2006; Parrah et al., 2013**). L'incidence de l'ulcère gastrique a été enregistrée entre 25 et 50 % chez les poulains et entre 80 et 90 % chez les chevaux de sport adultes (**Murray, 2009**) ; contre 48 % chez les chiens de sport (**Parrah et al., 2013**). Par ailleurs ; l'ulcère gastrique est peu fréquent chez le chat avec moins de 30 cas rapportés (**Liptak et al., 2002**). Le traitement médicamenteux de l'ulcère peptique a été rendu possible en grande partie par la disponibilité des inhibiteurs de la pompe à protons, des bloqueurs des récepteurs de l'histamine et des analogues de la prostaglandine (**Rengarajan et al., 2012**).

Les effets secondaires de ces médicaments ont été rapportés chez l'homme, mais n'ont pas encore été étudiés chez l'animal. Par ailleurs, diverses plantes sont utilisées dans les médecines complémentaires et alternatives pour la prise en charge de l'ulcère gastrique, en raison de leur toxicité minimale et de leur plus grande efficacité (**Afroza et al., 2014**). A titre d'exemple, les extraits d'*Hippophae rhamnoides* et de *Casearia sylvestris* sont utilisés dans la prévention de la formation d'ulcères gastriques en médecine équine (**Martinez et Silveira, 2006**).

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antiulcéreuse d'extraits et de substances à effet gastroprotecteur, parmi lesquelles :

III.4.1. Ulcère induit par ligature du pylore

La méthode de l'ulcère gastrique induit par ligature du pylore chez le rat est une technique simple et fiable mise en place par **Shay et al., (1945)**. La production d'ulcération est causée par l'accumulation de suc gastrique acide dans l'estomac après ligature du pylore.

Le pylore est ligaturé, en veillant à ce qu'il n'y ait ni dommage à l'approvisionnement en sang ni traction sur le pylore. Les composés à tester sont administrés soit par voie orale par gavage, soit par injection sous-cutanée.

Les animaux sont placés en observation tout au long de l'expérience puis sacrifiés sous anesthésie. L'estomac est retiré et le contenu gastrique est drainé puis titré pour mesurer l'acidité totale. Le nombre d'ulcères est noté et la gravité enregistrée par l'attribution de scores.

III.4.2. Ulcères induits par l'indométacine chez le rat

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, comme l'indométacine et l'acide acétylsalicylique, sont à l'origine de lésions gastriques chez l'homme et les animaux de laboratoire par inhibition de la cyclo-oxygénase entraînant une formation moindre du prostanoïde prédominant produit par la muqueuse gastrique, la prostacycline.

Cette méthode consiste à administrer les substances à tester dix minutes avant l'administration de l'indométacine à la dose de 20mg/kg, le tout par voie orale. Six à huit heures plus tard, les rats sont sacrifiés sous anesthésie et leurs estomacs sont prélevés. Les longueurs des diamètres les plus longs des lésions sont mesurées et additionnées pour donner un score de lésion total (en mm) pour chaque animal, le nombre moyen pour chaque groupe étant calculé.

D'autre part, en remplacement de l'indométacine, les lésions gastriques peuvent être induites par des doses intraveineuses ou orales d'aspirine qui peuvent être prévenues par des PGE2 ou PGI2 exogènes (**Konturek et al., 1981**). De plus, la réserpine à une dose de 8 mg/kg i.p., ou le chlorhydrate de cystéamine à une dose de 400 mg/kg s.c. a été administré pour induire des ulcères chez le rat (**Tarutani et al., 1985**).

III.4.3. Ulcère induit par l'éthanol chez le rat

L'application intra-gastrique d'éthanol absolu est une méthode reproductible pour produire des lésions gastriques chez les animaux de laboratoire (**Robert et al., 1979; Szabo et al., 1981**).

Ces lésions peuvent être au moins partiellement inhibées par divers médicaments, comme certaines prostaglandines. La méthode a été modifiée par plusieurs auteurs. Une méthode a été décrite pour quantifier objectivement l'étendue des lésions gastriques induites par l'éthanol en utilisant un densitomètre à transmission pour mesurer la densité optique du négatif photographique de la muqueuse de l'estomac (**Witt et al., 1985**).

Cette méthode repose sur l'administration par voie intra-gastrique des extraits et des substances à tester une demi heure avant l'administration de l'éthanol absolu. Une heure plus tard, les animaux sont euthanasiés et leurs estomacs excisés et étirés site muqueux vers le haut. Les scores subjectifs des tissus traités sont enregistrés ; la réponse graduée reflète le moins (0) au plus (3) dommage. Des paires de tissus de chaque estomac sont examinées pour minimiser les erreurs d'échantillonnage. Des photographies sont prises, le film est traité de manière standard et une planche contact est réalisée à partir des négatifs.

Un densitomètre à transmission lumineuse est utilisé pour évaluer les négatifs. La densité optique des tissus de test est déterminée en plaçant chaque zone du négatif en séquence sur l'ouverture à travers laquelle la lumière est transmise. La densité optique est affichée sur une lecture numérique et enregistrée. Les zones hémorragiques ou endommagées apparaissent claires sur le négatif, tandis que les tissus non endommagés apparaissent sombres. Par conséquent, des valeurs de densité optique inférieures indiquent des dommages tandis que des densités optiques plus élevées sont associées à peu ou, comme dans le cas du contrôle, à aucun dommage.

III.4.4. Ulcère gastrique subaigu chez le rat

Il s'agit d'une méthode décrite par **Ezer (1988)** pour produire des ulcères gastriques subaigus standard chez le rat et pour l'évaluation quantitative du processus de cicatrisation.

Au cours de cette expérience, les rats sont anesthésiés et un cathéter en polyéthylène comprenant un fin fil d'acier est inséré par voie orale dans l'estomac. Après que la canule a atteint la paroi gastrique, l'extrémité supérieure du fil d'acier est pressée de manière définitive, de manière à perforer la paroi gastrique. Chaque rat est maintenu dans la même position pendant l'intervention afin de localiser la ponction. Les substances à tester sont administrées par voie orale, 30 min ou 24 h après la ponction. Cicatrisation (**Takagi et al., 1969; Okabe et Pfeiffer, 1972; Ezer 1988**).

Les animaux sont sacrifiés par surdosage d'éther après ponction. L'estomac est disséqué et ouvert le long de la petite courbure, abondamment rincé à l'eau du robinet et fixé à l'extrémité d'un tube en polyéthylène de 10 mm de diamètre (embout en plastique d'une pipette automatique) en position avec l'ulcère perforé au centre. L'extrémité du tube avec la paroi gastrique est suspendue dans un bécher contenant du sérum physiologique, et la pression dans le tube est progressivement augmentée avec une bille en caoutchouc à valve reliée à l'autre extrémité du tube. La troisième partie du système est un tonomètre calibré jusqu'à 1 bar. On note la valeur de la tension à laquelle les bulles apparaissent au niveau de la paroi gastrique ulcéreuse. Cette valeur est appelée résistance à la traction et peut être exprimée en mm Hg. La guérison des ulcères gastriques peut être exprimée par le calcul du taux de cicatrisation réf biblio (Takagi et *al.*, 1969; Okabe et Pfeiffer, 1972; Ezer 1988).

III.4.5. Ulcère induit par ischémie-reperfusion gastrique chez le rat

Le principe de cette méthode repose sur l'effet de l'endothéline, un inhibiteur de l'enzyme de conversion, sur les lésions gastriques locales d'ischémie-reperfusion chez le rat (Hassan et *al.*, 1997). L'endothéline-1 est dotée de puissants effets ulcérogènes dans l'estomac (Wallace et *al.*, 1989).

Les rats mis en expérimentation sont anesthésiés et l'estomac est exposé par une laparotomie médiale. L'artère gastrique gauche est clampée par une petite pince vasculaire pendant 5 min pour induire une ischémie et 30 min de reperfusion se fait en relâchant la pince. Un prétraitement avec le médicament d'essai ou l'étalon est administré immédiatement avant l'induction de l'ischémie. A la fin de l'expérience, les rats sont sacrifiés par dislocation cervicale. L'estomac est fixé avec du formol tamponné à 10 % et photographié pour une évaluation macroscopique des blessures. Pour l'évaluation des lésions microscopiques, un échantillon de corpus à 0,5 cm sous la crête limitante contenant toute la largeur de la paroi antérieure est prélevé sur chaque estomac et traité pour une évaluation histologique ultérieure.

Un planimètre relié à un ordinateur permet de tracer la lésion macroscopique de la muqueuse à partir de photographies couleur. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la surface totale de la muqueuse glandulaire.

III.5. Activité antidiabétique

Le diabète sucré est un syndrome métabolique caractérisé par une hyperglycémie qui résulte d'un déficit de sécrétion d'insuline ou d'une sensibilité à l'insuline dans les tissus cibles ou les deux (**Gilor *et al.*, 2016**).

Le diabète sucré est une maladie couramment rencontrée en médecine canine et féline. Les caractéristiques cliniques décrites sont rarement observées chez d'autres grands animaux domestiques tels que les chevaux, les bovins, les buffles, les porcs et d'autres petits ruminants (**Niaz *et al.*, 2018**).

Le diagnostic de la maladie repose principalement sur l'existence des signes cliniques classiques, à savoir, la polyphagie, la polyurie, la polydipsie et la perte de poids ainsi que la persistance de l'hyperglycémie et de la glycosurie (**Behrend *et al.*, 2018**).

Bien que les mécanismes étiopathogéniques ne soient pas complètement identiques entre l'homme et l'animal, le « modèle humain » fournit un guide pour l'identification et la différenciation des différentes formes de la maladie chez les animaux (**Nelson et Reusch, 2014**).

L'hyperglycémie enregistrée au cours du diabète pourrait être la conséquence de plusieurs facteurs notamment, une diminution de la sécrétion d'insuline, une insulino-résistance, une réabsorption du glucose et une augmentation de la production de glucose (**Figure 21**). Cette physiopathologie du diabète est à l'origine de sa classification en plusieurs types.

Le diabète est ainsi classé en quatre types en fonction de l'étiopathogénie de la maladie. Le diabète de type 1 est associé à la destruction des cellules bêta à médiation immunitaire conduisant à une carence absolue en insuline. Le diabète de type 2 se caractérise par une altération de la sécrétion d'insuline associée à une résistance à l'insuline, ne nécessitant pas toujours de l'insuline pour sa prise en charge et se développe généralement chez les patients âgés, inactifs et obèses. Le troisième type, « autres types spécifiques », résulte de l'existence de maladies sous jacentes notamment, les maladies pancréatiques primaires et les endocrinopathies telles que l'hyperadrénocorticisme et l'hypersomatotropisme. Le dernier type est le diabète gestationnel (**Nerhagen et Mooney, 2017**).

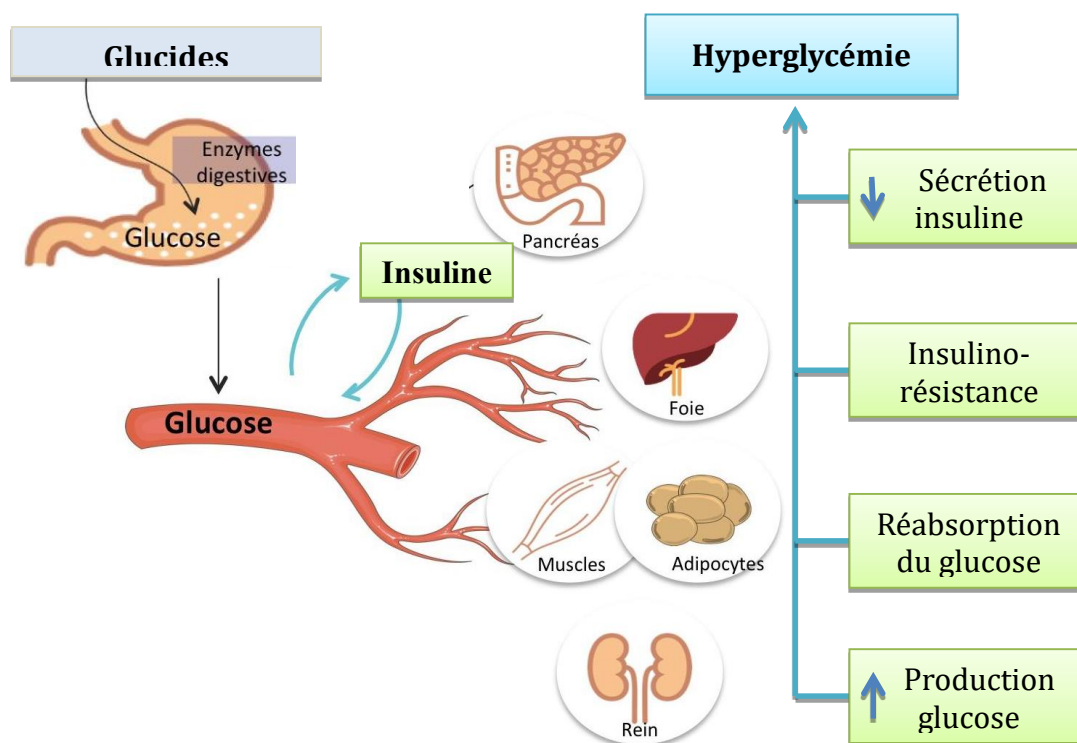


Figure 21 : Physiopathogénie du diabète [4]

Les modèles animaux expérimentaux sont l'une des meilleures stratégies pour comprendre la physiopathologie de toute maladie afin de concevoir et de développer des traitements. De nombreux modèles animaux ont été conçus au cours des dernières décennies pour étudier le diabète sucré et tester les agents antidiabétiques selon des méthodes chimiques, chirurgicales et génétiques. Parmi les méthodes les plus utilisées pour l'évaluation de l'activité antidiabétique :

III.5.1. Diabète induit par l'alloxane

Le diabète induit par l'alloxane est l'un des modèles largement utilisés pour induire le diabète sucré de type I chez les animaux de laboratoire. L'alloxane s'est avéré sélectivement toxique pour les cellules bêta pancréatiques car il s'accumule préférentiellement dans ces dernières sous forme d'analogues du glucose. De plus, l'action cytotoxique de l'alloxane est médiée principalement par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Ankur et Shahjad, 2012**).

En effet, l'action toxique de l'alloxane sur les cellules bêta pancréatiques implique l'oxydation des sulfhydryles essentiels (groupes -SH), l'inhibition de l'enzyme glucokinase, la génération de radicaux libres et des perturbations de l'homéostasie du calcium intracellulaire (**Dunn et**

McLetchie 1943; Ankur et Shahjad, 2012). Le mécanisme sous-jacent implique l'absorption sélective du composé en raison de sa similitude structurelle avec le glucose ainsi qu'au mécanisme d'absorption très efficace des cellules bêta pancréatiques (**Lenzen, 2008**).

L'hyperglycémie et la glycosurie apparaissant après administration d'alloxane ont été décrites chez plusieurs espèces, notamment, le chien (**Tasaka *et al.* 1988**), le lapin (**Baily et Baily, 1943**) et le rat (**Dunn et McLetchie 1943**). Les cochons d'inde se sont avérés résistants. La posologie et le schéma thérapeutique ont été élaborés pour les espèces les plus fréquemment utilisées. Chez la plupart des espèces, une évolution triphasique est observée : une augmentation initiale de la glycémie est suivie d'une diminution, probablement due à la déplétion des îlots d'insuline, à nouveau suivie d'une augmentation soutenue de la glycémie.

III.5.2. Diabète induit par la streptozotocine

La cytotoxicité spécifique de la streptozotocine pour les cellules bêta du pancréas a été signalée par Rakieten et ses collaborateurs (1963), en mettant en évidence son l'activité diabétogène (**Rakieten *et al.*, 1963**).

La streptozotocine est un antibiotique naturel produit par l'espèce bactérienne *Streptomyces achromogenes* (**Rees et Alcolado, 2005**). C'est un analogue structurel de la N-acétyl glucosamine qui agit comme un puissant agent alkylant qui entraîne une perturbation du transport du glucose, de l'activité de la glucokinase ainsi que la dégradation de plusieurs brins d'ADN (**Bolzan et Bianchi, 2002**).

Au fil des décennies, diverses combinaisons ont été utilisées pour développer des modèles animaux en utilisant la STZ, notamment, l'injection unique à forte dose (> 65 mg/kg PC) ou les injections multiples à faible dose (< 35 mg/kg PC). Ces modèles du diabète induit par la streptozotocine ou l'alloxane sont généralement caractérisés par une hyperglycémie à jeun ou non, de faibles taux sériques d'insuline et une hyperlipidémie; toutefois, la résistance à l'insuline est absente. En raison de cette limitation, bien que ces modèles ne puissent pas être considérés comme des modèles appropriés pour le diabète type 2, ils peuvent être utilisés pour le dépistage des médicaments anti-hyperglycémiantes ou insulinothèques et des médicaments naturels (**Islam et Wilson, 2012**).

Le diabète induit par la streptozotocine chez les animaux de laboratoire, principalement chez les rats, est devenu un outil précieux dans la recherche sur le diabète, utilisé par de nombreux chercheurs.

III.5.3. Autres produits diabétogènes

Plusieurs autres composés sont utilisés dans l'induction du diabète, parmi lesquels :

La dithizone est un composé organosoufré doté de propriétés chélatrices (**Karthikeyan *et al.*, 2016**). La dithizone agit en imperméabilisant les membranes et complexant le zinc à l'intérieur des liposomes, libérant ainsi des protons, ce qui favorise la diabétogénicité (**Maske et Weinges, 1957**).

Un autre composé diabétogène l'aurothioglucose dont l'administration intrapertoneale chez les animaux de laboratoire entraîne progressivement de l'obésité, l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline pendant une période de 16 à 20 semaines. L'aurothioglucose augmente également les lipides corporels, la lipogenèse hépatique, la sécrétion de triglycérides et diminue le métabolisme du glucose (**Karthikeyan *et al.*, 2016**).

Le glutamate monosodique, autre produit diabétogène, agit en entraînant une augmentation de la concentration plasmatique de glutamate, ce dernier module l'activité des cellules Beta-pancréatiques stimulant ainsi la libération d'insuline (**Vijayaraj *et al.*, 2019**). L'administration du glutamate monosodique chez la souris entraîne une obésité associée à une hyperinsulinémie. Après 29 semaines, les souris ont présenté des taux de glycémie, cholestérol total et triglycérides augmentés (**Karthikeyan *et al.*, 2016**).

III.6. Activité antioxydante

L'oxydation est une réaction chimique qui transfère des électrons ou de l'hydrogène d'une substance à un agent oxydant. Les réactions d'oxydation peuvent produire des radicaux libres. À leur tour, ces radicaux peuvent déclencher des réactions en chaîne, lorsque les réactions en chaîne se produisent dans une cellule, elles peuvent être à l'origine de dommages ou de la mort de la cellule (**Moharram et Youssef, 2014**).

Des recherches récentes ont permis de classer les radicaux libres en différents types. Les trois principales catégories sont : les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les espèces réactives de l'azote (RNS) et les espèces réactives du soufre (RSS), qui sont formées à partir d'atomes d'oxygène, d'azote et de soufre, respectivement (**Carocho et Ferreira, 2013**). Ces radicaux libres sont responsables d'un grand nombre de maladies dont le cancer, les maladies cardiovasculaires, de troubles neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou de colite ulcéreuse, du vieillissement et de l'athérosclérose (**Alama *et al.*, 2013**).

Par ailleurs, les antioxydants sont des composés capables de retarder ou d'inhiber les processus d'oxydation qui se produisent sous l'influence de l'oxygène atmosphérique ou d'espèces réactives de l'oxygène. Ils sont impliqués dans le mécanisme de défense de l'organisme contre les pathologies causées par l'attaque des radicaux libres **(Pisoschi et Negulescu, 2011)**.

Les antioxydants sont classés en deux grandes catégories endogènes et exogènes. Les antioxydants endogènes sont de deux types enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion, peroxydase) et non-enzymatiques (albumine, bilirubine, acide urique). Lorsque les ressources endogènes en antioxydants sont dépassées, le recours aux antioxydants exogènes est alors nécessaire. Ces derniers peuvent provenir de sources naturelles (vitamines, flavonoïdes, anthocyanes, certains composés minéraux), mais peuvent également être des composés synthétiques, comme le butylhydroxyanisole, le butylhydroxytoluène, les gallates, etc **(Litescu et al., 2011)**.

Il existe une variété de tests *in vitro* et *in vivo* pour la détermination de l'activité anti-oxydante totale. Les tests spectrophotométriques ont reçus plus de considération de part leur simplicité, leur facilité, leur reproductibilité et leur moindre coût. Les tests *in vitro* fréquemment utilisés pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante sont illustrés dans le **Tableau 3 (Christodoulou et al., 2022)**.

Par ailleurs, il existe plusieurs méthodes d'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vivo* (Tableau 3), parmi lesquelles l'estimation de la réduction du glutathion **(Ellman, 1959)**, estimation de la glutathion peroxydase **(Wood, 1970)**, méthode de la superoxyde dismutase **(Mccord et Fridovich, 1969)**, pouvoir de réduction ferrique du plasma **(Benzie et Strain, 1996)**, activité de la catalase **(Aebi, 1984)** et le dosage de la peroxydation lipidique **(Okhawa, 1979)**.

Tableau 3 : Tests spectrophotométriques pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro*

Essai	λ (nm)	Principe	Détermination	Virage
DPP	515-520	Réaction anti-oxydante avec des radicaux organiques libres	Colorimétrique	Rose / jaune
CUPRAC	450-490	Mesure de la capacité des antioxydants à réduire le Cu (II) en Cu (I)	Colorimétrique	Bleu / orange
FRAP	593	Mesure de la capacité des antioxydants à réduire le Fe (III) en Fe (II)	Colorimétrique	Bleu clair / bleu foncé
ABTS	414, 645-650, 734, 815-820	Mesure de la capacité relative des antioxydants à piéger l'ABTS généré en phase aqueuse	Colorimétrique	Bleu foncé / bleu clair
ORAC et HORAC	485-525 et 485-535	Réaction anti-oxydante avec les radicaux peroxy et les radicaux OH générés de la réaction de Fenton	Colorimétrique	Bleu clair / bleu foncé
FOX	550-560	Mesure des niveaux du peroxyde d'hydrogène dans les systèmes biologiques par oxydation du Fe (II) en Fe (III)	Colorimétrique	Jaune / bleu
Piégeage du peroxyde d'hydrogène	460	Mesure de la capacité totale de piégeage des oxydants par les antioxydants	Fluorescence	Bleu / jaune
Piégeage du radical superoxyde	560-562	Mesure de la capacité totale de piégeage des oxydants par les antioxydants	Colorimétrique	Jaune / bleu
Piégeage du radical oxyde nitrique	540	Mesure de la capacité totale de piégeage des oxydants par les antioxydants	Colorimétrique	Transparent / rouge

(Christodoulou *et al.*, 2022)

Pour toutes les méthodes *in vivo*, les substances à tester sont généralement administrées aux animaux mis en expérimentation (souris, rats, etc.) selon un schéma posologique défini tel que décrit par la méthode choisie. Après une période de temps déterminée, les animaux sont généralement sacrifiés et du sang ou des tissus sont prélevés et utilisés pour les besoins du test (Alama *et al.*, 2013).

III.7. Activité antimicrobienne

Les bactéries pathogènes multi-résistantes responsables de maladies infectieuses sont une préoccupation majeure de santé publique. L'efficacité clinique de la chimiothérapie antimicrobienne contre l'infection bactérienne est compromise dans les cas où les agents en cause sont résistants à plusieurs agents antimicrobiens structurellement distincts (**Varela et Kumer, 2019**). La chronologie du développement d'une résistance cliniquement significative est multifactorielle et dépend de plusieurs paramètres, tels que la quantité de l'antibiotique utilisée, la fréquence de sa prescription, les réservoirs des mécanismes de résistance existants, le nombre de mutations nécessaires pour l'émergence de la résistance et l'aptitude des organismes résistants (**Walsh, 2003**).

En raison de l'incapacité des antimicrobiens disponibles à traiter certaines maladies infectieuses, de nombreux chercheurs se sont concentrés sur l'étude des produits naturels comme source de nouvelles molécules bioactives (**Valgas et al., 2007**). La découverte de nouveaux antibiotiques est un objectif majeur. Les produits naturels restent l'une des principales sources de nouvelles molécules médicamenteuses (**Balouiri et al., 2016**).

Les plantes et autres sources naturelles peuvent fournir une vaste gamme de composés complexes et structurellement divers. En effet, plusieurs études récentes ont été menées dans le but de faire valoir le potentiel antimicrobien d'extraits végétaux et microbiens, d'huiles essentielles, de métabolites secondaires purs et de nouvelles molécules synthétisées (**Nazzaro et al., 2013**).

Diverses méthodes de laboratoire peuvent être utilisées pour évaluer ou cribler l'activité antimicrobienne *in vitro* d'un extrait ou d'un composé pur. Les méthodes les plus couramment employées sont représentées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Méthodes fréquentes d'évaluation de la sensibilité aux antibactériens

Méthodes	Type	Milieu de culture	Avantages	Inconvénients
Diffusion sur disques	Qualitative	Gélose MH	Simple, faible coût, teste un grand nombre de bactéries, facilité d'interprétation	Pas de détermination de CMI
Micro-dilution	Quantitative	Bouillon MH	Détermination de CMI, reproductible, économie de réactif et d'espace due à la miniaturisation du teste	-
Macro-dilution	Quantitative	Bouillon MH	Détermination de CMI	Fastidieuse, risque d'erreur, quantité importante de réactif utilisé et d'espace requis
Dilution sur gélose	Quantitative	Gélose MH	Idéale pour la détermination de la CMI des bactéries fastidieuses telles que les espèces anaérobies et <i>Helicobacter</i>	Quantité importante de milieu utilisé
Time-kill test	Quantitative	Bouillon MH	Détermination de l'effet bactéricide et des effets synergique et antagoniste	-

(CLSI M26-A, 1998 ; CLSI M02-A11, 2012; CLSI M07-A9, 2012; Balouiri *et al.*, 2016)

Partie Expérimentale

Objectif de l'étude

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la valorisation de notre patrimoine végétal par la mise en évidence des propriétés médicinales d'une plante tropicale du Sahara algérien *Solenostemma argel*. Elle a pour principal objectif l'étude de la composition phytochimique, l'innocuité et les propriétés pharmacologiques de trois extraits (acétonique, méthanolique, aqueux) et de l'huile essentielle de *S. argel* ainsi que leurs applications possibles en phytothérapie vétérinaire.

La partie expérimentale de cette thèse comprend cinq axes :

- ❖ **Un premier axe** portant sur une enquête ethnobotanique mettant en évidence l'utilisation de *S. argel* en médecine traditionnelle, en élevage et en usage domestique par les Touaregs ;
- ❖ **Le deuxième axe** correspond à une étude phytochimique, décrivant la préparation des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* ainsi que de son huile essentielle et l'analyse de leurs compositions phytochimiques par les techniques LCMS, GCMS et RMN dans le but de connaître leurs principaux constituants et ainsi mieux comprendre leurs propriétés pharmacologiques ;
- ❖ **Le troisième axe** aborde l'étude toxicologique des extraits et de l'huile essentielle de *S. argel* par l'évaluation de leur toxicité aiguë orale selon le protocole de référence de l'OCDE dans le but de déterminer leur innocuité ainsi que l'évaluation de leur cytotoxicité par le test de létalité des *Artemia salina* en vue d'apporter des renseignements préliminaires sur leur potentiel anticancéreux ;
- ❖ **Le quatrième axe** évalue les propriétés pharmacologiques des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que de l'huile essentielle de *S. argel*, dans le but d'apporter une preuve scientifique de l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle et ainsi enrichir la connaissance de son potentiel bioactif. Cet axe est divisé en deux parties :
 - **Une première partie « Etudes *In Vitro* »** qui comprend :
 - L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* par la méthode de réduction du radical chimique DPPH ;

- L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits acétonique, méthanolique, aqueux et de l'huile essentielle de *S. argel* par la méthode de diffusion sur gélose ainsi que la détermination des CMI par la méthode de microdilution sur microplaque et des CMB par ensemencement sur milieu solide.
- **Une deuxième partie « Etudes *In Vivo* »** qui comprend :
 - L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* selon trois modèles expérimentaux à savoir : le modèle de l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat, le modèle de l'œdème de l'oreille de souris induit par le xylène et le modèle du granulome induit par les pellets de coton chez le rat ;
 - L'évaluation des effets de l'huile essentielle et des extraits de *S. argel* sur la douleur périphérique et centrale selon trois modèles expérimentaux : le test de torsions induites par l'acide acétique, le test au formaldéhyde et le test sur plaque chauffante ;
 - Mise en évidence de l'effet cicatrisant de trois pommades à base des extraits acétonique, méthanolique et aqueux et d'une crème à base de l'huile essentielle de *S. argel* selon le modèle de l'excision chez les rats ;
 - Evaluation de l'activité antiulcéreuse de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* selon deux modèles expérimentaux, à savoir : le modèle de l'ulcère induit par l'aspirine chez le rat et le modèle de ligature du pylore chez le rat ;
 - Evaluation des effets des extraits acétonique, méthanolique et aqueux sur les complications liées au diabète induit par l'alloxane chez les rats, notamment la neurodégénérescence par évaluation de l'expression de la protéine chaperonne HSP70.
- ❖ **Un cinquième axe** portant sur quelques applications des extraits acétonique, méthanolique, aqueux et de l'huile essentielle de *S. argel* en médecine vétérinaire. Huit cas cliniques portant sur des animaux sauvages et domestiques ainsi que deux essais cliniques sont présentés.

Le matériel utilisé et les méthodes adoptées lors de cette étude expérimentale y seront détaillés et les résultats obtenus présentés et discutés par partie.

Le traitement statistique des données a été réalisé sur le logiciel XLSTAT Version 7.1 et le logiciel IBM SPSS Statistics Version 20. Toutes les valeurs ont été exprimées en moyenne $\pm$ écart type. Les résultats obtenus ont été analysés statistiquement par une ANOVA à un facteur et à deux facteurs suivie d'un test de comparaison multiple post hoc des différences entre les groupes en appliquant le test Tukey HSD. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs à $p < 0,05$.

Enquête Ethnobotanique

Enquête ethnobotanique

Une enquête ethnobotanique portant sur les utilisations ancestrales de *Solenostemma argel* en médecine traditionnelle, a été menée auprès de la population Touareg de la région de l’Ahaggar. L’ethnobotanique se définit comme l’étude des relations entre les plantes et l’homme (**Turner, 1996**). Elle repose à la fois sur la connaissance fondamentale des plantes et sur celle des sociétés humaines. Elle fait donc appel aux outils de la systématique botanique (flores locales, clés d’identification...) et à ceux des ethnologues pour connaître les usages des plantes dans les sociétés traditionnelles (observations des modes de vie, enquêtes auprès des populations locales...) (**Balick et Cox, 1996**).

1. Site d’étude

L’Ahaggar est une région caractérisée par sa grande biodiversité, classé parc national culturel en 1987 (**Décret exécutif n°11-87, 2011**). Le parc de l’Ahaggar est localisé à l’extrême sud de l’Algérie dans la wilaya de Tamanrasset. Il s’étale actuellement sur 633 887 km² et concerne les communes de Abalessa, In Amguel, Aine Guezame, Tamanrasset, Tin Zaouatine, Tazrouk, Ideles, In Salah, In Ghar, Fougarta Azouaia (**Djemouai, 2008**) (**Figure 22**).



Figure 22 : Carte topographique du Parc National de l’Ahaggar [6].

Notre site d’étude a concerné la commune d’Abalessa, située à 80 km du chef-lieu de la wilaya de Tamanrasset (**Figures 23 et 24**). Abalessa est l’ancienne capitale de l’Ahaggar, connue pour son célèbre monument le tombeau de TinHinane. La commune est située à 1000°m d’altitude

au confluent des deux oueds intermittents : Oued Rellachene et Oued Iheri. Abalessa abrite également une partie des montagnes de l'Ahaggar dont l'altitude avoisine les 1200 m (ONS, 2008). Abalessa signifie « lieu cultivable » en langue Tifinagh, en effet, la région est caractérisée par une végétation importante dans les vallées fluviales.



Figure 23 : Carte topographique du site d'étude Abalessa [7].



Figure 24 : Site d'étude « Abalessa » Tamanrasset (Photos prises le 15/01/2015)

2. Enquête

L'enquête a porté sur les utilisations ancestrales de *Solenostemma argel* en médecine traditionnelle par la population Touareg de l'Ahaggar. Elle a été réalisée auprès de la population

autochtone dans le but de récolter le maximum d'informations sur les parties de la plante utilisée, les formes d'administration et les symptômes traités par la plante.

Un modèle de fiche d'enquête ethnobotanique a été élaboré afin de recueillir les renseignements de manière systématique (**Annexe 1**).

3. Cueillette

La cueillette de *S. argel* a été effectuée à 1000 m d'altitude au niveau du lit d'oued Abalessa à 120 km de la ville de Tamanrasset (**Figure 25**). Une autorisation nous a été délivrée par l'Office du Parc National Culturel de l'Ahaggar pour la cueillette et le transport des échantillons de *S. argel* afin d'être analysés en laboratoire.



Figure 25 : Cueillette de *S. argel* au site d'Abalessa- Tamanrasset
(Photos prises le 15/01/2015)

4. Résultats de l'enquête

4.1. Parties de la plante utilisée

Les résultats de notre enquête montrent que toutes les parties de *S. argel* sont utilisées en médecine traditionnelle. Cependant, les parties aériennes de la plante sont plus prisées que les

parties souterraines et la plante entière (**Figure 26**). Des résultats similaires ont été rapportés sur *S. argel* d'Egypte (**Abdel-Motaal et al., 2022**). Les feuilles de *S. argel* sont les parties les plus utilisées par la population Touareg de l'Ahaggar.

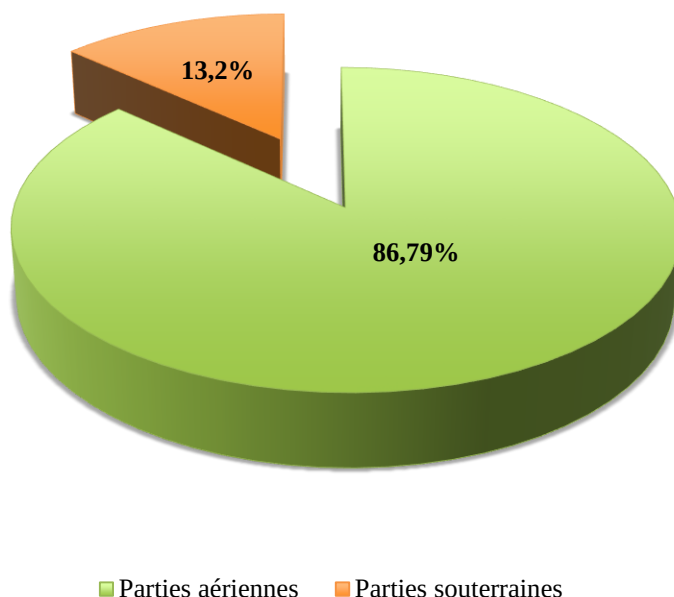


Figure 26 : Parties de *S. argel* utilisées par la population Touareg de l'Ahaggar.

4.2. Affections traitées

Solenostemma argel est utilisée dans la médecine traditionnelle par le peuple Touareg pour le traitement de plusieurs affections notamment, la fièvre, la constipation, les coliques, les maux d'estomac, la toux, les infections urinaires, les infections pulmonaires, le rhume et les états grippaux, le diabète, le rhumatisme, la sciatique, la névralgie, les coliques rénales et les plaies (**Figure 27**).

L'étude de **Benhouhou (2005)** a également rapporté l'utilisation de *S. argel* pour le traitement de la toux, le rhumatisme, le diabète, les infections et les plaies (**Benhouhou, 2005**). De plus, les branches des plantes sont utilisées dans les abreuvoirs des animaux pour lutter contre les insectes nuisibles. Enfin, *S. argel* sert également à des usages domestiques, en effet, les Touaregs utilisent les feuilles et la sève de la plante pour produire du savon.

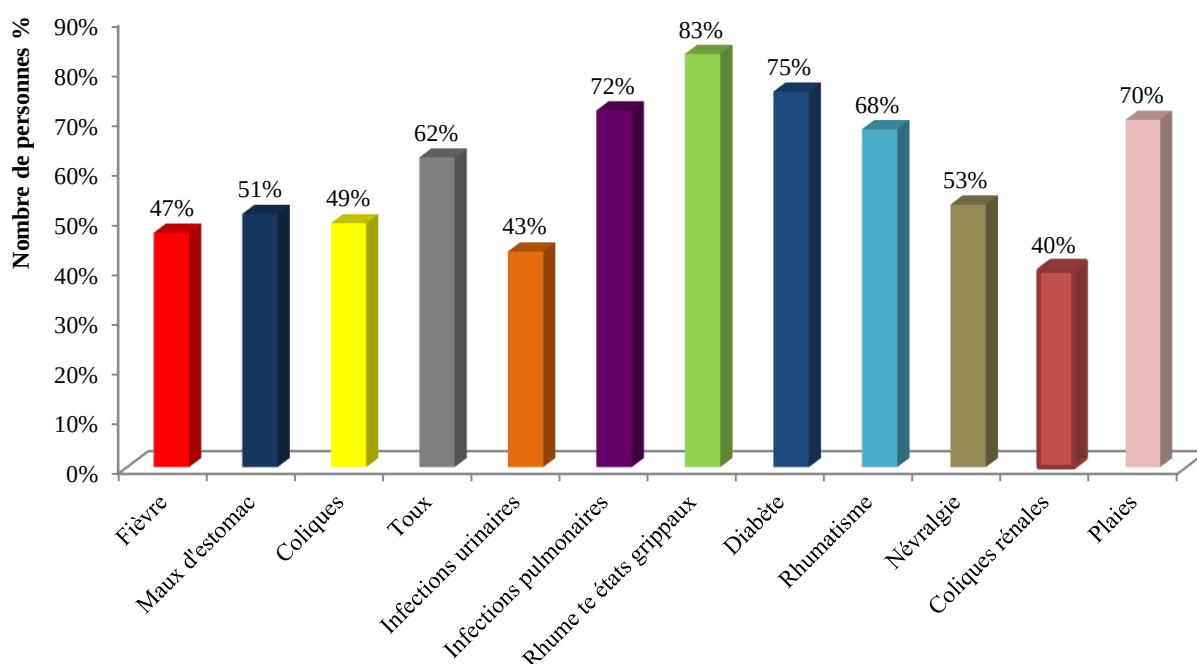


Figure 27 : Affections traitées par *S. argel* au sein de la population Touareg

4.3. Formes d'administration

Au cours de notre enquête, plusieurs formes d'utilisation de *S. argel* ont été signalées. Les diverses parties de la plante sont utilisées seules ou associées à d'autres produits tel que le lait, l'huile d'olive et les dattes. La plante est employée fraîche, séchée, broyée en poudre ou en grosses particules.

Les Touaregs font bouillir les feuilles séchées réduites en poudre dans du lait sucré avec des dattes ou du sucre, et la décoction se boit pour traiter les rhumatismes, la gonorrhée et l'hémoptysie. Il nous a été signalé que les fruits s'instillaient dans les yeux pour soigner les états grippaux, alors que, la sève est utilisée pour le traitement des plaies.

Par ailleurs, l'infusion de parties aériennes traite le diabète et la jaunisse, alors que celle des feuilles et des fleurs est indiquée pour purifier le sang et calmer les nerfs.

Le **Tableau 5** illustre l'utilisation ancestrale de *S. argel* en médecine traditionnelle.

Tableau 5 : Résultats de l'enquête ethnobotanique sur l'utilisation traditionnelle de *S. argel* par le peuple Touareg.

Parties de <i>S.argel</i>	Formes d'administrations	Affections traitées
Parties aériennes	Décoction	Fébrifuge, purgatif, maux d'estomac, coliques, constipation, flatulences, infections urinaires, douleurs rénales, toux
	Infusion	diabète, jaunisse
Feuilles	Décoction	Bronchite, névralgie, sciatique, hémoptysie, rhumatisme, fébrifuge, purgatif, maux d'estomac, coliques, constipation, flatulences, infections urinaires, douleurs rénales, toux.
	Infusion	Purification du sang, apaisement des nerfs Fabrication de savon
Fruits	Instillation	Rhume et états grippaux
Fleurs	Infusion	Purification du sang, apaisement des nerfs
Sève	-	Traitement des plaies Fabrication de savon
Branches	Dans l'eau	Insecticide

5. Conclusion

Les résultats de notre enquête ont mis en évidence la place importante qu'occupe la plante *S. argel* au sein de la population Touareg aussi bien dans la médecine traditionnelle que dans l'élevage des animaux et dans l'usage domestique.

Etude Phytochimique

Etude phytochimique

Les premières étapes de l'étude de la plante *Solenostemma argel* furent l'extraction et la détermination de la composition chimique de ses extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que celles de son huile essentielle. La caractérisation phytochimique des extraits et de l'huile essentielle étudiés est une étape primordiale pour la compréhension des effets pharmacologiques étudiés.

1. Collecte et identification de la plante

Les parties aériennes de *S. argel* (Delile) Hayne ont été collectées à une altitude de 1400 m, entre les mois de janvier et mars 2015, 2017, 2018, 2019 et 2020 au niveau Abalessa, à 120 km de la ville de Tamanrasset (22° 47' 13" Nord, 5° 31' 38" Est) - Algérie.

La plante a été séchée à l'air, à température ambiante, dans un endroit sec et aéré. Son identification a été réalisée par le Professeur Benhouhou du Département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie (ENSA) d'El-Harrach d'Alger, avec établissement d'un certificat d'identification.

2. Extraction

2.1. Extrait acétonique

Le procédé d'extraction de *S. argel* s'est fait selon la méthode d'Eloff (**Eloff, 1998**). Les feuilles de la matière végétale ont été broyées en une poudre fine à l'aide d'un broyeur. Les étapes qui ont suivi sont illustrées dans la **Figure 28**.

Le poids de l'extrait sec obtenu après évaporation pour 24g de matière végétale est de 1,171g correspondant à 4,87%.

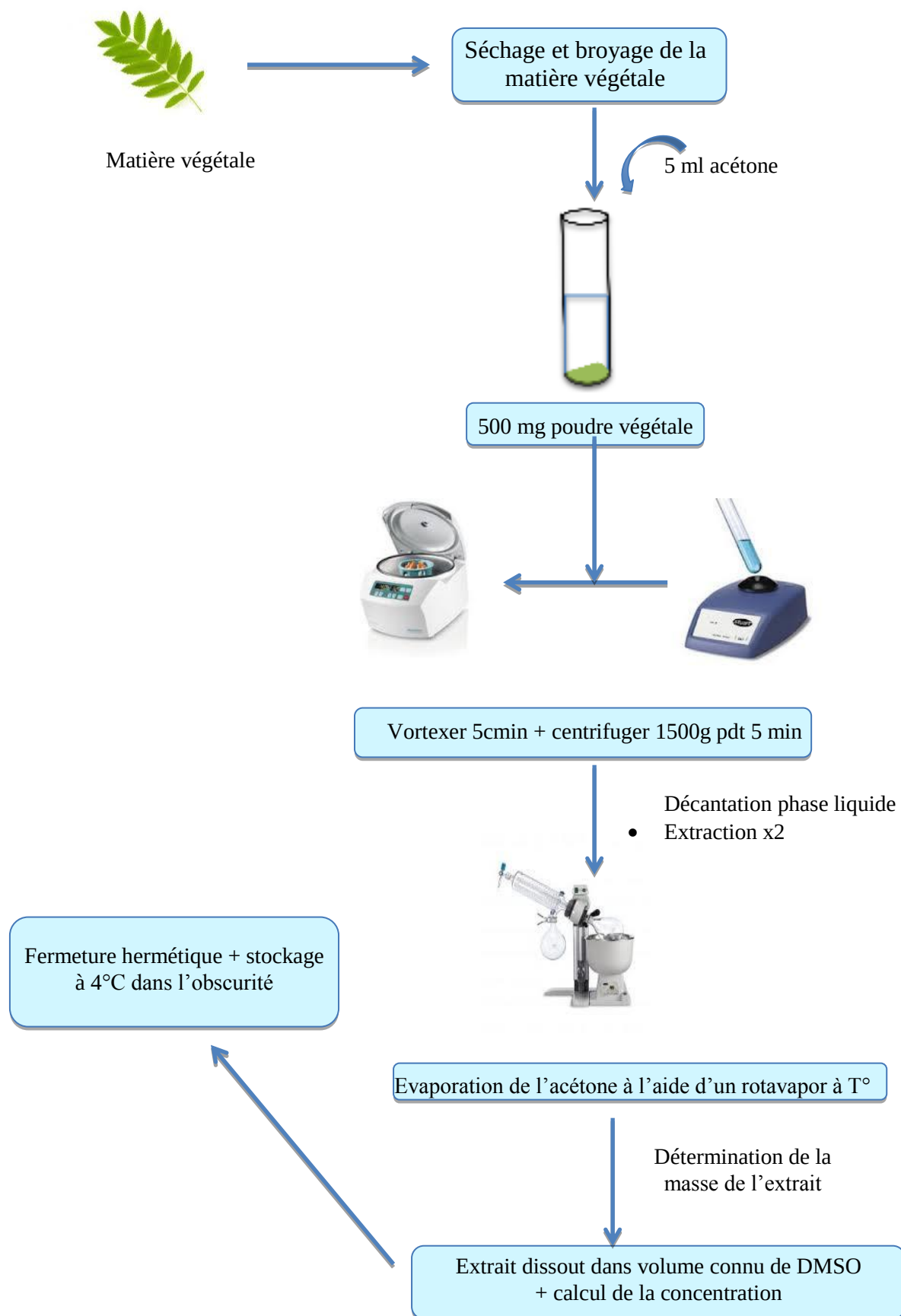


Figure 28 : Procédé d'extraction de l'extract acétonique de *S. argel* (Eloff, 1998)

2.2. Extrait méthanolique

La poudre des feuilles de *S. argel* obtenue par cryobroyage (200 g) a subi une macération dans 700 ml de méthanol pendant 24 h sous agitation magnétique et à température ambiante. Cette opération a été répétée trois (03) fois avec renouvellement du solvant à chaque fois (**Figure 29**).

Après filtration, les extraits méthanoliques obtenus ont été réunis et concentrés à sec sous pression réduite et à une température modérée (environ 45°C). Le poids de l'extrait sec obtenu est de 20.6g correspondant à un rendement de 10,3%.

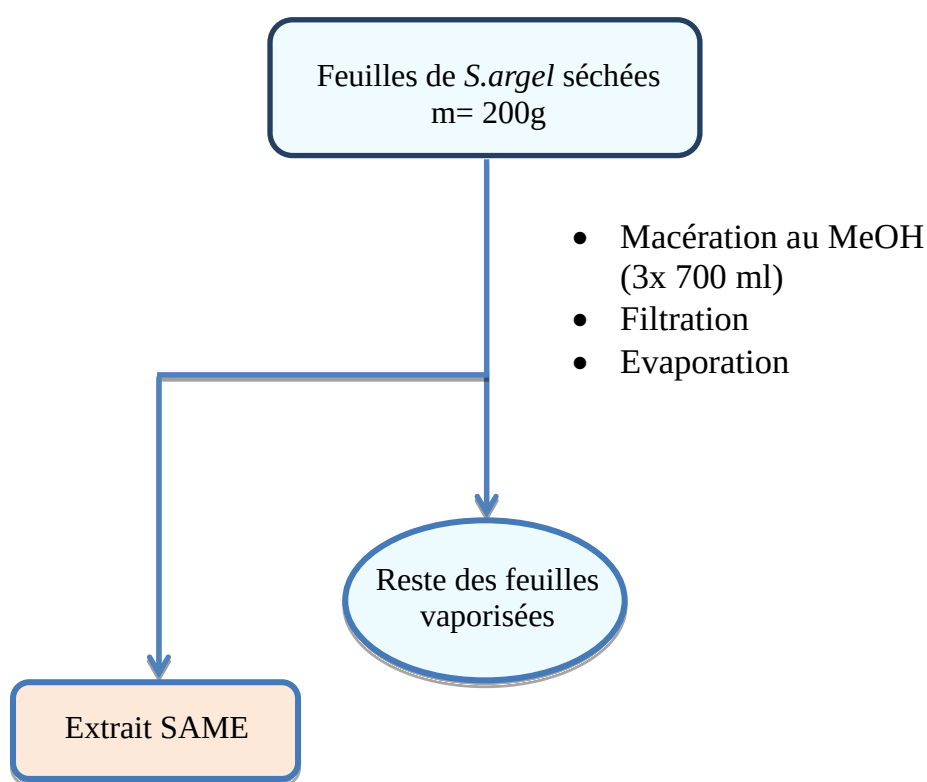


Figure 29 : Procédé d'extraction de l'extrait méthanolique de *S. argel*.

2.3. Extrait aqueux

La préparation du décocté de *S. argel* a été réalisée en introduisant dans un Erlen Meyer de 1000 ml, 1000 ml d'eau bouillante R et 10 g de poudre grossière. Le mélange est maintenu à ébullition pendant 30 min au bain-marie « décoction ». Le décocté obtenu est filtré à chaud dans un Erlen Mayer propre, laissé à refroidir puis ajusté à 1000 ml.

Après ajustement du volume, le décocté de *S.argel* a été concentré à sec par lyophilisation afin d'obtenir un lyophilisat de l'extrait aqueux de la plante (**Figure 30**). Le poids de l'extrait sec obtenu après lyophilisation est de 6,8g correspondant à un rendement de 68%.

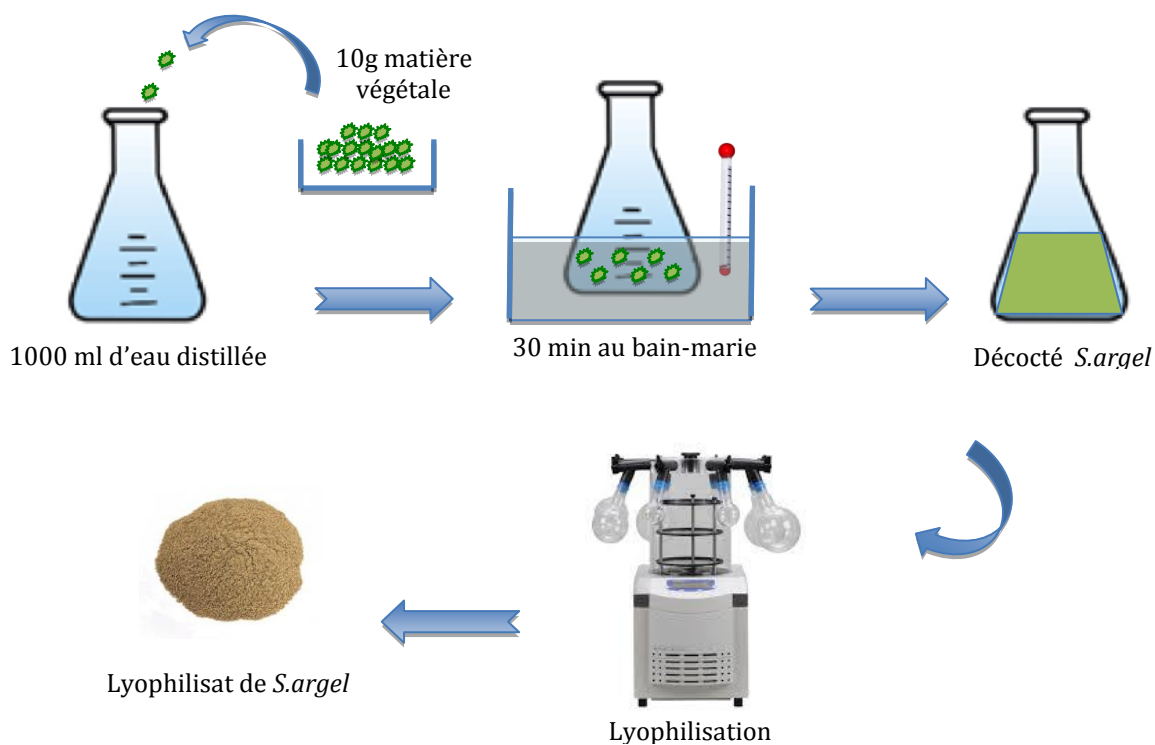


Figure 30 : Procédé d'extraction de l'extrait aqueux lyophilisé de *S. argel*.

2.4. Huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *S.argel* a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Cent cinquante grammes (150 g) de feuilles broyées ont été mis dans un ballon rond de 1000 ml et additionnés d'eau distillée. Le mélange a été hydrodistillé pendant 4 h (**Figure 31**). L'huile essentielle obtenue a été conservée dans un flacon stérile ambré scellé et conservée au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation.

Les pourcentages d'huile essentielle ont été exprimés en volume (ml) d'huile essentielle pour 100 g de matière végétale (v/p).

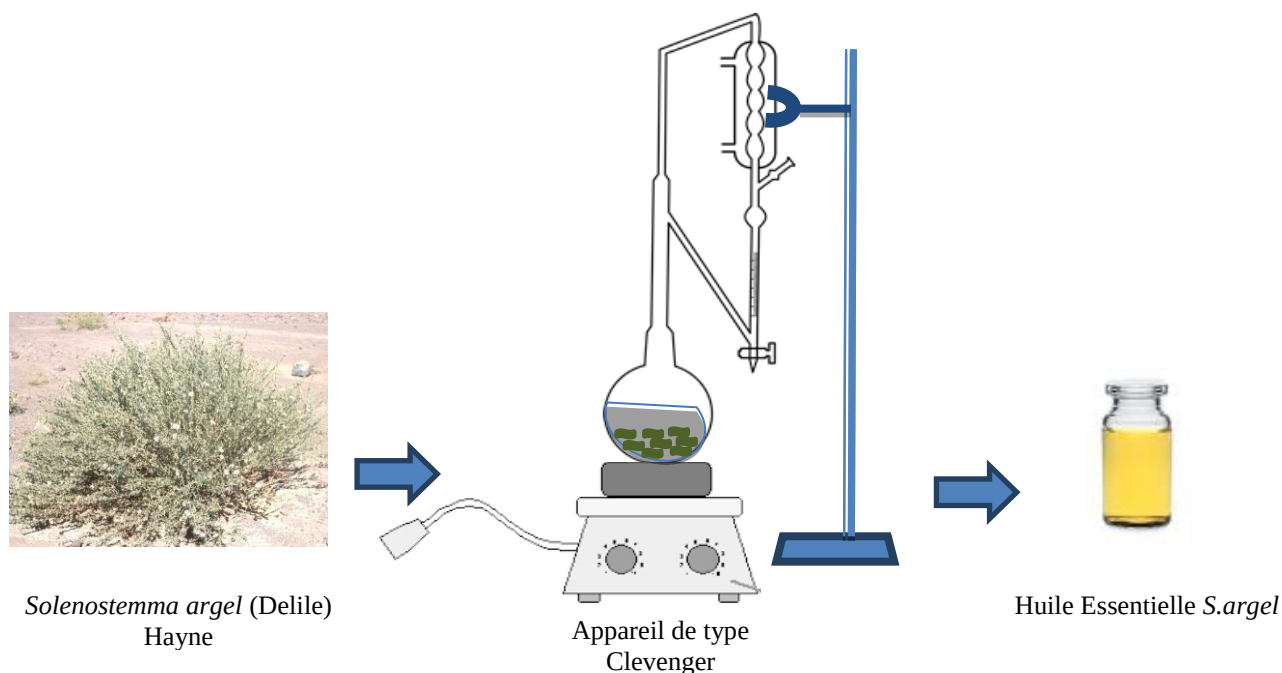


Figure 31 : Extraction de l'huile essentielle de *S. argel* par hydrodistillation

3. Détermination de la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux

3.1. Méthode

3.1.1. Dosage des polyphénols totaux

La méthode utilisée est basée sur la quantification de la concentration totale des groupements hydroxyles présents dans l'extrait, en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu.

Un mélange de 0,2 ml d'extrait, 0,8 ml d'eau distillée et 0,1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu a été tout d'abord incubé à température ambiante pendant 3 min. Après l'ajout de 0,3 ml de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 20% (p/v), le mélange est encore incubé à température ambiante pendant 120 min. L'absorbance du mélange a été mesurée à 765 nm (**Figure 32**). Les teneurs en polyphénols totaux ont été exprimées en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g), calculées à partir d'une courbe standard tracée en utilisant une gamme de solutions ayant des concentrations allant de 5 à 100 $\mu\text{g/ml}$ d'acide gallique ($y = 0,0082x + 0,0971$; $R^2 = 0,99191$). Chaque mesure est répétée trois fois (**Waterhouse, 2002**).

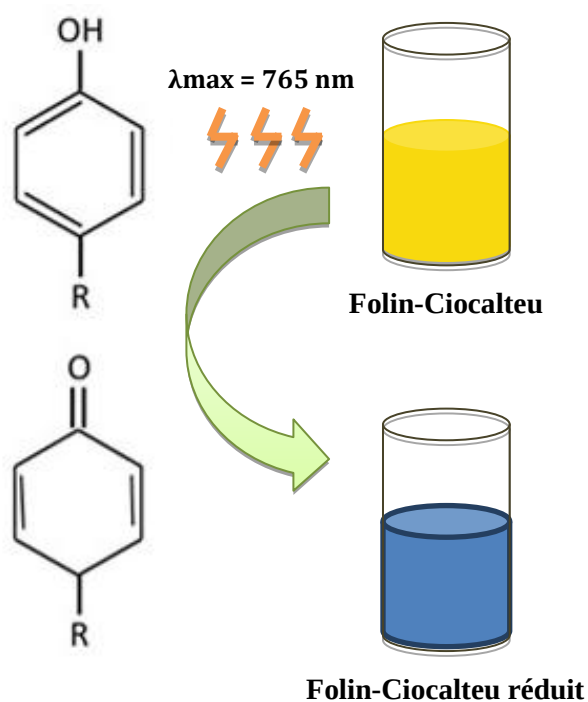


Figure 32 : Réaction de réduction du réactif Folin-Ciocalteu par oxydation des phénols présents dans l'extrait

3.1.2. Teneur en flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes est estimée par la méthode de Chlorure d'Aluminium (AlCl_3). Cette méthode est basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-Aluminium qui se forme dans le mélange extrait- AlCl_3 (**Figure 33**).

Le protocole suivi consiste à mélanger 0,5ml d'extrait avec 0,5 ml de la solution d' AlCl_3 à 2% préparée dans le méthanol. Après incubation du mélange à température ambiante pendant 10 min, les absorbances sont mesurées à 440 nm. Dans les mêmes conditions, une gamme de solutions de quercétine (2-20 mg/l) est préparée. Les teneurs des flavonoïdes ont été déduites d'une courbe standard ($y = 0,0438x - 0,0296$; $R^2 = 0,99244$) et exprimées en mg d'équivalent de quercétine par g d'extrait (mg EQ/g). Chaque mesure est répétée trois fois (**Quettier-Deleu et al., 2000**).

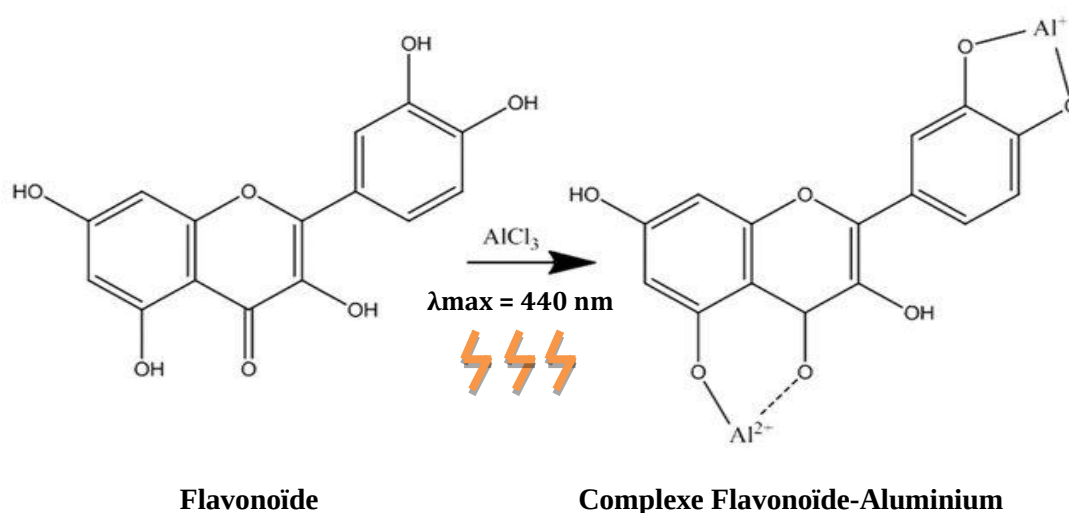


Figure 33 : Principe de quantification des flavonoïdes par la méthode de chlorure

3.2. Résultats

Les résultats obtenus pour les dosages des polyphénols et flavonoïdes totaux sont représentés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6 : Dosages des polyphénols et des flavonoïdes totaux

	SAAC	SAME	SAAQ
TPC (mg GAE/g extract)	10,95 ± 0,35	15,15±0,11	14,47±0,23
TFC (mg QE/g extract)	38,85 ± 0,28	41,56±0,43	34,46±0,43

SAME: Extrait méthanolique de *S.argel*, **SAAC**: Extrait acétonique de *S.argel*,
SAAQ: Extrait aqueux de *S.argel*

4. Analyse UHPLC/DAD/ESI-MS²

4.1. Méthode

L'analyse phytochimique des extraits acétoniques, méthanoliques et aqueux lyophilisés des feuilles de *Solenostemma argel*, a été réalisée par la technique UHPLC/DAD/ESI-MS².

Le système UHPLC était composé d'une boucle variable de 20 microlitres (capacité de flacon de 2 ml réglée à 5 °C), d'une pompe LC et d'un détecteur PDA (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). La séparation des composés a été réalisée avec un programme d'élution en gradient à un débit de 0,2 ml/min, à 30 ° C, en utilisant une colonne Hypersil Gold C18

(100x2,1 mm; 1,9 µm) fournie par Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, San Jose, Californie, États-Unis). Le volume d'injection dans le système UHPLC était de 2 microlitres et la phase mobile était constituée d'acide formique 0,1% (A) et d'acétonitrile (B). Le gradient linéaire suivant a été appliqué : 0 – Xmin: X% B, X – Y min: 0 – X% B, X – Y min: X – Y% B, suivi d'un rééquilibrage de la colonne pendant XX min avant la prochaine course. La détection en ligne a été effectuée dans le détecteur à barrettes de diodes, à XX et YY nm, et des spectres UV dans une plage de 190 à 700 nm ont également été enregistrés.

La HPLC a été couplée à un spectromètre de masse à piège à ions linéaire LTQ XL (ThermoFisher SCIENTIFIC, San Jose, CA, USA), équipé d'une source d'ionisation orthogonale à électrospray fonctionnant en mode négatif. La gaine d'azote et le gaz auxiliaire étaient respectivement de 50 et 10 (unités arbitraires). La tension de pulvérisation était de 5 kV et la température capillaire était de 275 °C. Les tensions capillaires et de réglage des lentilles ont été réglées respectivement à -28V et -115V. L'acquisition des données a été réalisée en utilisant le système de données Xcalibur® (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

4.2. Résultats

Une analyse qualitative de la composition des extraits acétoniques, méthanoliques et aqueux des feuilles de *S. argel* a été réalisée en utilisant la technique UHPLC / DAD / ESI-MS² en mode d'ionisation négative. Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux 7, 8 et 9 respectivement.

4.2.1. Extrait acétonique

L'analyse UHPLC de l'extrait acétonique des feuilles de *S. argel* a permis l'identification de 16 composés dont 3 acides phénoliques, 8 flavonoïdes et 5 saponines. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 7** et la **Figure 34**.

Tableau 7 : Identification des données UHPLC / DAD / ESI-MS² de l'extrait acétonique de *S.argel*

Rt (min)	λ_{max}	$[\text{M-H}]^-$ (m/z) [♦]	ESI-MS ²	Composés
7.96	239, 270, 303	137	137 (100), 110 (65), 119 (90)	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (Salicylic acid derivative)
8.25	240, 268	137	137 (100), 110 (55), 119 (60)	<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid (Salicylic acid)
8.48	222, 267	563	517 (100), 504 (60), 536 (25), 545 (20), 519 (15)	Apigenin-O-pentosyl hexosid
11.24	256, 308, 355	609	300 (100), 301 (30), 445 (30), 489 (20), 463 (15), 271 (15), 255 (10)	Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (Rutin)
11.99	195, 265, 349	593	429 (100), 284 (70), 285 (50), 447 (20), 255 (15), 473 (15)	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside
12.6	239, 268	771	607 (100), 427 (70), 285 (60), 713 (60)	Kaempferol-3- <i>O</i> - diglucoside-7- <i>O</i> -glucoside
12.87	242, 265, 350	447	284 (100), 285 (90), 327 (35), 255 (10)	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside (Astragalin)
13.39	226, 282	1047	Not fragmented under the used conditions	Saponin derivative
13.72	240, 272, 294	901	527 (100), 725 (90), 707 (80), 545 (70), 593 (60), 266 (60)	Saponin derivative
13.84	241, 269, 299	1047	Not fragmented under the used conditions	Saponin derivative
14.65	245	553	391 (100), 535 (50), 506 (20), 469 (20), 373 (30), 347 (20), 301 (20), 257 (15), 233 (15), 375 (10), 311 (10), 425 (10)	Quercetin derivative
16.76	228, 271, 295, 324	693	341 (100), 385 (80), 353 (40), 649 (30), 661 (30), 485 (20), 557 (20), 609 (10), 301 (10), 249 (10)	Quercetin derivative
17.23	243	137	137 (100), 110 (60), 119 (35)	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid (Salicylic acid derivative)
17.79	243, 267, 364	285	285 (100)	Kaempferol
21.64	244, 267	1159	275 (100), 211 (20), 235 (15), 265 (10)	Saponin derivative
21.85	264	1053	747 (100), 891 (90), 1034 (70), 859 (60)	Stemmoside F

Temps de rétention (Rt), longueur d'onde maximale (λ_{max}), masse moléculaire (m/z), fragments MS2 et identification des composés.

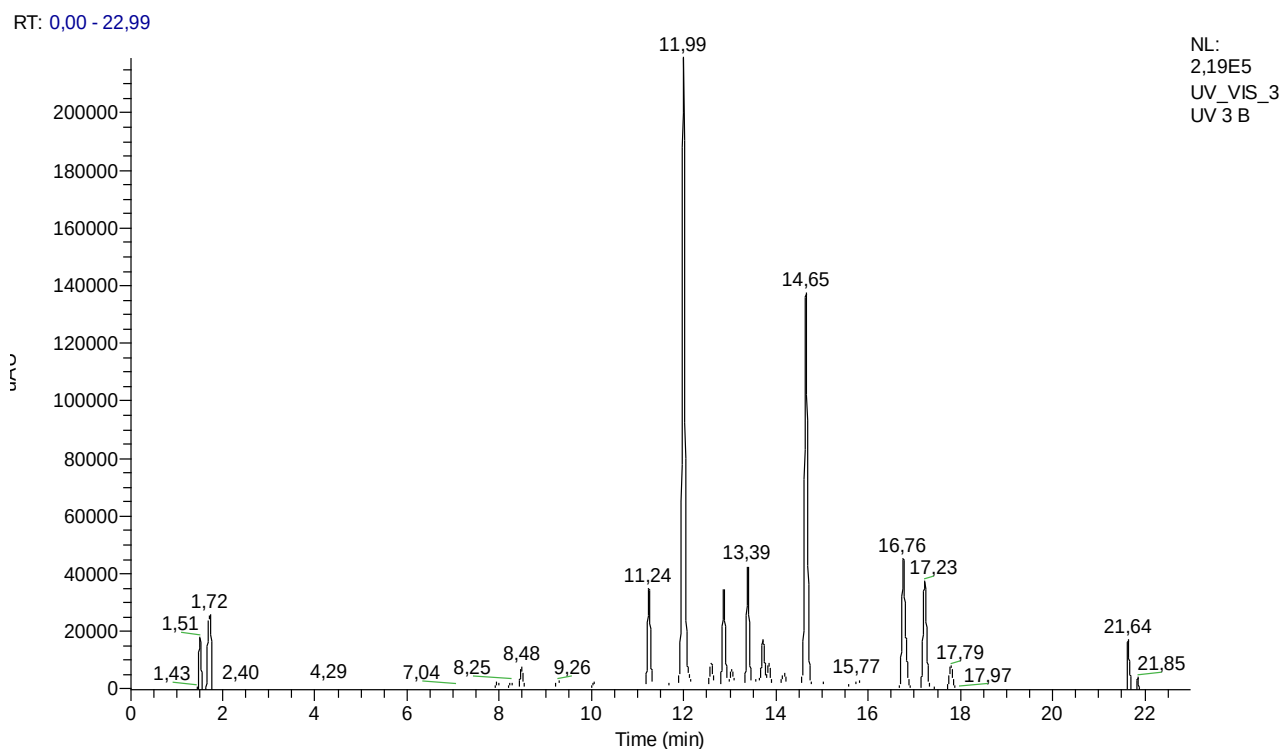


Figure 34 : Chromatogramme UHPLC de l'extrait acétonique de *S. argel* enregistré à 370 nm.

4.2.2. Extrait méthanolique

L'analyse UHPLC de l'extrait méthanolique des feuilles de *S. argel* a permis la mise en évidence de 28 composés dont 10 acides phénoliques, 9 flavonoïdes, 5 saponines et 4 composés non identifiés. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 8** et la **Figure 35**.

Tableau 8 : Identification des données UHPLC / DAD / ESI-MS² de l'extrait méthanolique de *S. argel*

Rt (min)	λ_{max}	[M-H] ⁻ (m/z) [♦]	ESI-MS ²	Composés
1,5	207	387	341 (100)	α -1-Caffeoylglucose derivative
1,72	206, 319	387	341(100)	α -1-Caffeoylglucose derivative
1,92	248	137	137 (100), 118 (20), 110 (10), 92 (20), 81 (10)	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid
7,81	203, 229, 276	137	137 (100), 118 (50), 109 (50), 92 (30), 109 (20), 81 (10), 65 (10)	<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid (Salicylic acid)
7,99	239, 323	563	519 (100), 178 (80), 527 (80), 489 (60), 397 (25), 492 (25), 324 (20), 193 (10)	Apigenin-O-pentosyl hexoside

8,26	197, 242, 265, 344	137	137 (100), 109,96 (70), 118,95 (50), 92,81 (10), 81,98 (10), 66,25 (10)	<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid isomer
8,38	236, 315, 368	395	349 (100)	1-Hexanol-pentosylhexoside, 3-acetyl-4-caffeoylquinic acid
8,49	222, 266	563	517 (100), 423 (10)	Apigenin-O-pentosyl hexoside
9,3	242, 262, 339, 351	395	349 (100)	1-Hexanol-pentosylhexoside, 3-acetyl-4-caffeoylquinic acid
9,39	210, 239, 262	327	147 (100), 165 (20), 119 (10), 112 (5)	Caffeoyl alcohol 3/4-O-hexoside
9,85	103, 255, 353	137	137 (100), 109 (70), 119 (60), 109 (30), 106 (20), 92 (20), 96,13 (10), 81 (10), 65 (10)	<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid isomer
11,27	228, 271, 295, 324	609	300 (100), 301 (20), 489 (30), 445 (20), 271 (20), 255 (20)	Quercetin-3-O-rutinoside (Rutin)
12,01	195, 265, 345	593	284 (100), 285 (50), 429 (60), 255 (40), 447 (20), 473 (20), 327 (10)	Kaempferol-3-O-rutinoside
12,62	238, 271, 315, 326	771	609 (100), 573 (80), 349 (30), 590 (20), 689 (20), 739 (20), 711 (10), 462 (10)	Kaempferol-3-O-diglucoside-7-O-glucoside
12,89	195, 265, 343	447	285 (100), 327 (40), 255 (10)	Kaempferol-3-O-glucoside (Astragalin)
13,42	226, 282	1047	661 (100)	Saponin derivative
13,57	243, 276, 315	587	241 (100), 569 (90), 196 (30), 352 (30), 501 (30), 531 (20), 543 (20), 275 (20), 309 (10), 341 (5), 168 (5)	Non identifié
13,75	240, 284, 315	901	739 (100), 593 (60), 707 (50), 675 (20), 304 (20), 431 (10), 531 (5), 611 (5)	Saponin derivative
13,88	240, 274	1047	Non fragmenté	Non identifié
14,21	243, 281, 323	763	652 (100), 735 (90), 631 (60), 683 (60), 479 (60), 312 (50), 296 (20)	Non identifié
14,69	245	553	535 (100), 391 (65), 469 (65), 475 (40), 191 (40), 517 (30), 493 (30), 479 (20), 371 (20), 301 (20), 345 (10), 309 (15), 203 (20), 227 (20)	Quercetine derivative
16,81	230, 248, 276, 324	693	341 (100), 385 (90), 353 (50), 649 (60), 661 (60), 249 (20), 557 (20), 678 (20), 609 (10), 485 (10), 301 (10)	Quercetine derivative
17,27	245	137	137 (100), 109 (50), 118 (40), 108 (20), 92 (10), 81 (20)	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid isomer
17,84	248, 265, 296, 329	285	285 (100)	Kaempferol

20,93	208, 235, 267	1131	Non fragmenté	Non identifié
21,66	241	1159	275 (100), 211 (30), 235 (20), 265 (10), 249 (5), 171 (10), 185 (5)	Saponin derivative
21,87	262	1053	890 (100), 748 (30), 859 (30), 309 (20), 536 (10), 764 (10), 932 (10), 1034 (20), 968 (5)	Stemmoside F
21,99	248	1055	892(100), 748 (80), 860 (60), 1022 (10)	Saponin derivative

Temps de rétention (Rt), longueur d'onde maximale (λ_{max}), masse moléculaire (m/z), fragments MS² et identification des composés

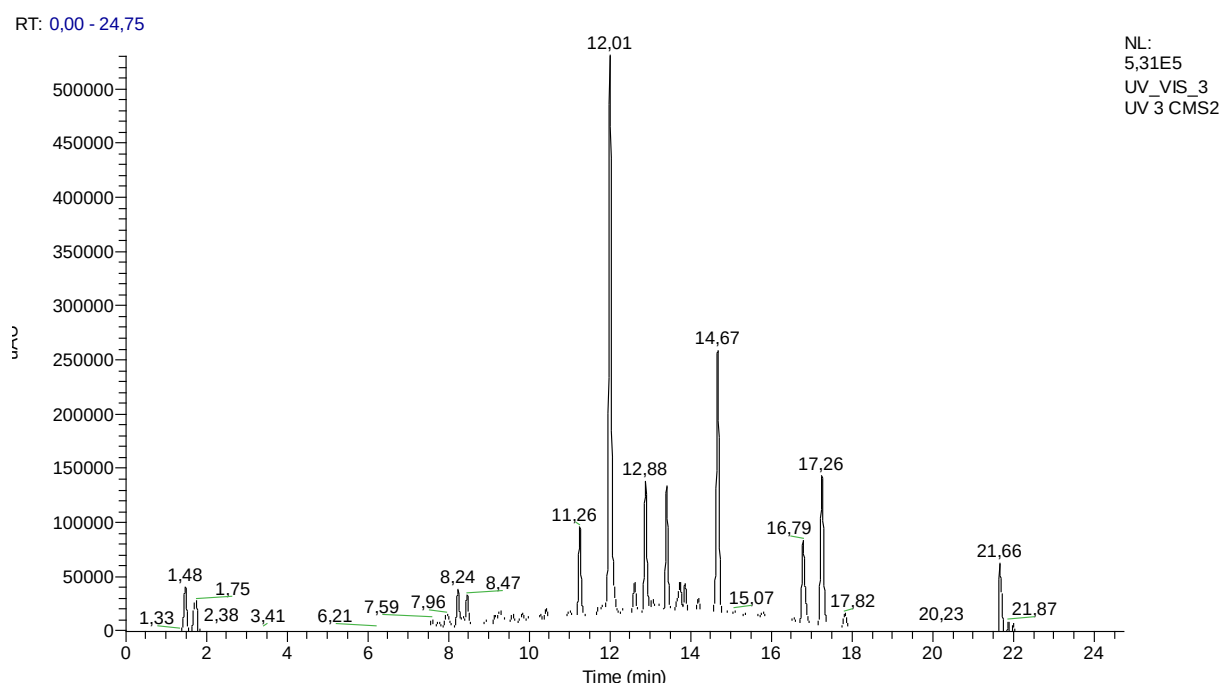


Figure 35 : Chromatogramme UHPLC de l'extrait méthanolique de *S.argel* enregistré à 370 nm.

4.2.3. Extrait aqueux lyophilisé

L'analyse UHPLC de l'extrait aqueux lyophilisé des feuilles de *S.argel* a permis la détermination de 28 composés dont 11 acides phénoliques, 10 flavonoïdes, 1 lignane, 2 saponines et 4 composés non identifiés. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 9** et la **Figure 36**.

Tableau 9 : Identification des données UHPLC / DAD / ESI-MS² de l'extrait aqueux lyophilisé de *S.argel*

Rt (min)	λ_{max}	$[M-H]^-$ (m/z) [♦]	ESI-MS ²	Composés
1,47	204, 268, 357, 368	387	341 (100)	α -1-Caffeoylglucose derivative
1,74	280, 318	137	137 (100), 109 (20), 93 (20), 118 (10), 82 (10), 65 (10)	<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid (Salicylic acid)
1,87	254	137	137 (100), 109 (20), 93 (20), 118 (10), 82 (10), 65 (10)	<i>p</i> -hydroxybenzoic acid
7,95	236, 300, 320	293	131 (100)	Non identifié
8,24	241, 265, 347, 367	137	137 (100), 118 (45), 109 (40), 93 (20), 65 (20)	<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid isomer
8,37	238, 273, 306, 325	395	349 (100)	1-Hexanol-pentosylhexoside, 3-acetyl-4-caffeoylquinic acid
8,47	222, 265	563	517 (100), 531 (40), 544 (40), 402 (20), 209 (40), 176 (40)	Apigenin-O-pentosyl hexoside
9,24	242	395	517 (100), 423 (10)	1-Hexanol-pentosylhexoside, 3-acetyl-4-caffeoylquinic acid
9,37	208, 241	327	147 (100), 164 (20), 118 (10)	Caffeoyl alcohol 3/4-O-hexoside
9,59	239, 310, 368	501	193 (100), 149 (20), 337 (20), 355 (20), 177 (10), 235 (10)	Ferulic acid derivative
9,83	240, 328	137	137 (100), 118 (65), 109 (60), 93 (20), 65 (20)	<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid isomer
10,42	241, 325, 367	367	191 (100), 193 (10), 172 (10)	5-O-Feruloylquinic acid
11,25	204, 255, 353	609	300 (100), 301 (25), 445 (25), 463 (20), 489 (20), 271 (20), 255 (10)	Quercetin-3-O-rutinoside (Rutin)
11,81	251, 336, 367	497	451 (100)	Non identifié
12	196, 265, 345	593	284 (100), 285 (50), 429 (80), 447 (20), 473 (20), 327 (20), 255 (20)	Kaempferol-3-O-rutinoside
12,6	238, 270, 314, 328, 347, 368	771	285 (100), 609 (95), 711 (90), 573 (65), 593 (50), 372 (40), 619 (20), 727 (20), 753 (20)	Kaempferol-3-O-diglucoside-7-O-glucoside
12,86	243, 268, 307, 332, 368	417	373 (100), 402 (80), 399 (65), 329 (40), 287 (40), 355 (40), 166 (40), 181 (40), 217 (20), 267 (20), 243 (20), 281 (20), 127 (10)	Syringaresinol
13,19	243, 268, 328, 368	931	593 (100), 607 (20), 631 (20), 285 (10)	kaempferol-3-O-feruloyldihexoside-7-O-rhamnoside
13,41	225, 282	1047	853 (100)	Saponin derivative

13,61	242	587	241 (100), 587 (20), 572 (10), 345 (10)	Non identifié
13,86	243, 270	1047	Non fragmenté	Saponin derivative
14,67	246	553	535 (100), 469 (60), 391 (55), 519 (55), 373 (40), 507 (40), 538 (40), 493 (30), 247 (30), 301 (30), 343 (30), 160 (10)	Quercetine derivative
15,07	243, 276, 328	601	583 (100), 557 (95), 522 (80), 573 (50), 518 (50), 529 (45), 439 (45), 327 (45), 469 (40), 317 (40), 275 (20), 206 (20), 193 (20)	Ferulic acid derivative
15,32	245, 280, 325	639	301 (100), 323 (90), 463 (90), 477 (80), 315 (65), 621 (50), 445 (45), 330 (20), 192 (20), 287 (10), 271 (10), 231 (10)	Quercetin-O-feruloyl-hexoside
15,8	247	301	179 (100), 151 (60), 257 (20), 273 (20), 193 (10), 301 (10)	Quercetin
16,79	250, 275, 292, 325	693	341 (100), 385 (90), 649 (65), 661 (60), 353 (45), 609 (30), 557 (30), 485 (30), 249 (25), 301 (20), 207 (20)	Quercetine derivative
17,25	245	391	347 (100), 373 (95), 329 (80), 345 (50), 363 (30), 376 (30), 319 (30), 273 (30), 235 (30), 148 (10)	Non identifié
17,81	265,368	285	285 (100)	Kaempferol

Temps de rétention (Rt), longueur d'onde maximale (λ_{max}), masse moléculaire (m/z), fragments MS² et identification des composés

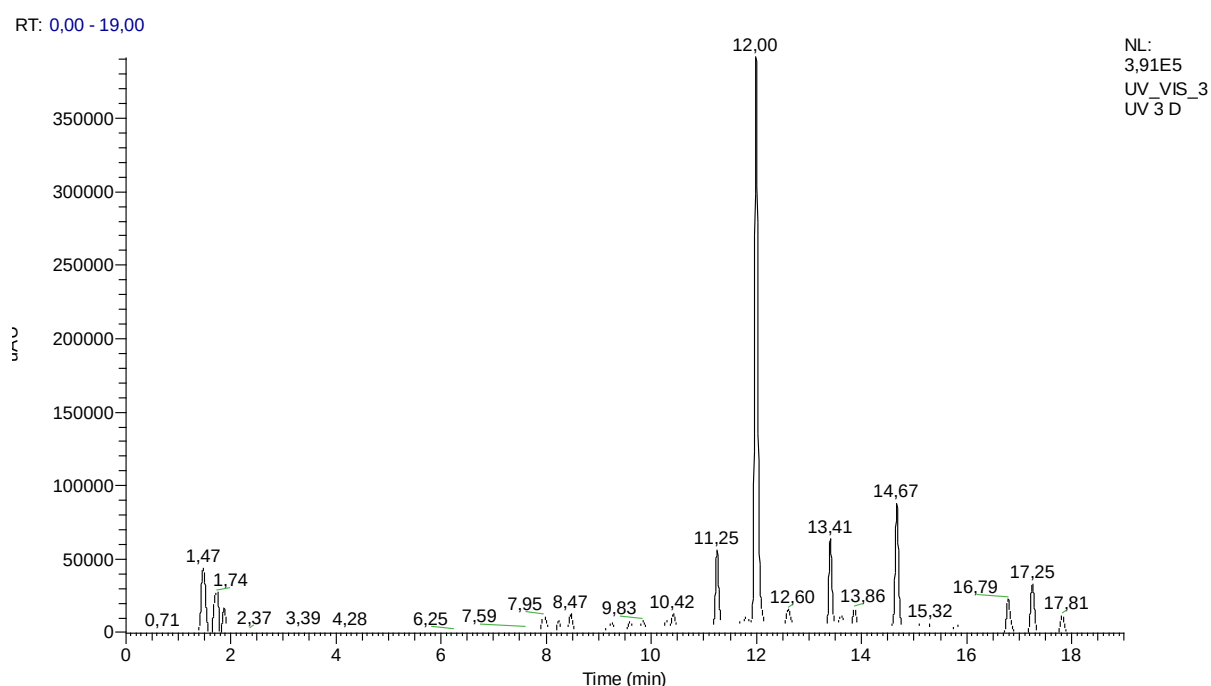


Figure 36 : Chromatogramme UHPLC de l'extrait aqueux de *S. argel* enregistré à 370 nm

4.3. Discussion

Le profil de la composition des extraits acétonique, méthanolique et aqueux des feuilles de *S. argel* a été établi en utilisant la technique UHPLC / DAD / ESI-MS² en mode d'ionisation négative. Les résultats obtenus sont représentés dans **les tableaux 7, 8 et 9** respectivement.

L'analyse qualitative des trois extraits a révélé un certain nombre de composés en commun. En effet, les pics de masse de 137 m/z ont été attribués à l'acide salicylique (acide *o*-hydroxybenzoïque) en se basant sur leur spectre UV, leur masse et leur fragmentation MS² comparativement à la littérature disponible (**Kammerer et al., 2005; Ibrahim et al., 2015**).

De plus, les fragmentations MS² détectées pour d'autres pics de même masse que celle citée précédemment, suggèrent qu'il s'agit de dérivés d'acide salicylique l'acide *p*-hydroxybenzoïque (**Sun et al., 2007; Reed et al., 2009; Regos et al., 2009**). Aussi, le flavone glycosylé apigenin-O-pentosyl hexoside a pu être mis en évidence dans les trois extraits en prenant en compte les données de la littérature.

De même, trois flavonols glycosylés ont pu être identifiés dans la composition des trois extraits étudiés, à savoir, la quercétine-3-O-rutinoside (rutine) (**Lin et al., 2008 (a); Abu-Reidah et al., 2015; Chen et al., 2015; Elsadig Karar et al., 2016; Singh et al., 2017**), le kaempferol-3-O-rutinoside (**Monagas et al., 2007; Lin et al., 2008 (a); Chen et al., 2015**) et le kaempferol-3-O- diglucoside-7-O-glucoside (**Llorach et al., 2003; Harbaum et al., 2007**) respectivement, par la comparaison de leurs spectres UV, leurs masses moléculaires et leurs fragments MS² avec la littérature. Fait intéressant, seul le kaempférol a été détecté sous sa forme aglycone, là encore la confirmation était basée sur des données de la littérature (**Justesen, 2000; Llorach et al., 2003; Monagas et al., 2007; Lin et al., 2008 (b)**).

D'autre part, parmi les composés en commun des trois extraits analysés, deux pics ont été détectés aux masses moléculaires de 553 m/z et 693 m/z respectivement, montrant dans leurs fragments MS² des ions de masse de 301 m/z correspondant à la fraction quercétine, ce qui suggérerait que ces composés soient des dérivés de la quercétine.

Par ailleurs, le flavonol glycosylé kaempférol-3-O-glucoside (Astragalin) n'a pu être identifié que dans les extraits acétoniques et méthanoliques des feuilles de *Solenostemma argel* par la comparaison de leur spectre UV, leurs masses et leur fragmentation MS² avec les données de la littérature (**Pikulski et Brodbelt, 2003; Schieber et al., 2003; Ibrahim et al., 2015; Chen et**

al., 2015; **Elsadig Karar et al.**, 2016; **Singh et al.**, 2017). D'autre part, trois acides phénoliques ont été mis en évidence dans les extraits méthanoliques et aqueux des feuilles de *S. argel*, il s'agit du dérivé de l' α -1-Caffeoylglucose (**Rahmouni et al.**, 2018), de l'acide 3-acetyl-4-caffeoylquinic (**Singh et al.**, 2017) et du Caffeoyl alcohol 3/4-O-hexoside (**Martini et al.**, 2017).

Dans des enquêtes préliminaires sur la plante, le kaempférol (**Khaled et Novak**, 1974), la quercétine, la rutine et une saponine inconnue (**El-Fishawy**, 1976) ont été isolés. L'étude de Michael en 1998 sur les constituants chimiques des feuilles de *S. argel* a identifié le flavonol glycoside kaempferol-3-O-rutinoside et l'aglycone kaempferol (**Michael**, 1998). Des travaux antérieurs ont également rapporté la présence du kaempférol-3-O-rutinoside et du kaempférol-3-O-glucoside (astragaline) dans l'extrait méthanolique des feuilles de *Solenostemma argel* (**Innocenti et al.**, 2005). Ces données corroborent les résultats de notre étude.

Enfin, l'existence de dérivés de saponine a pu être rapportée dans la composition des trois extraits. Les pics présentant l'ion $[M-H]^- = 1047$ m/z peuvent correspondre à la polyphylline G (M=1048) et/ou à une forme isomérique. Malheureusement, dans nos conditions expérimentales ces composés ne se sont pas fragmentés, par conséquent cette identification n'a pas pu être confirmée, néanmoins, la richesse reconnue de l'espèce *S. argel* en saponines (**Hassan et al.**, 2001) peut permettre cette supposition, d'autant plus que cette saponine était déjà trouvée dans d'autres espèces végétales (**Schulten et al.**, 1984).

De même, le composé détecté à l'ion $[M-H]^- = 901$ m/z peut être attribué à des dérivés de saponine trouvés dans d'autres plantes, par exemple la chikusetsusaponine L5 dont la masse est de 902 (**Wan et al.**, 2012; **Wang et al.**, 2015). De plus, le composé détecté à l'ion $[MH]^- = 1053$ m/z peut être identifié comme étant le stemmoside F dont la masse est de 1054. En fait, l'étude menée précédemment sur la caractérisation chimique de l'extrait éthanolique de *S. argel* par ESI-MS et RMN ont permis d'identifier le Stemmoside F (**Plaza et al.**, 2005).

Bien que certaines de ces saponines n'aient jamais été trouvées dans le genre *Solenostemma*, leur présence ne serait pas une surprise. Néanmoins, des études phytochimiques complémentaires doivent être réalisées pour confirmer l'identification proposée.

5. Analyse GCMS

5.1. Méthode

L'huile essentielle de *S. argel* a été analysée par GC-MS. L'analyse GC-MS a été réalisée à l'aide d'une interface de chromatographie en phase gazeuse Agilent technologies 7890A avec un détecteur sélectif de masse Agilent 5975 C.

L'instrument et l'acquisition des données ont été réalisés avec le logiciel Chem-station.

La colonne capillaire analytique était en HP5-MS (30 m × 0,25 mm i.d, épaisseur du film 0,25 mm). La température de l'injecteur était de 250 °C, le volume d'injection 0,2 µl et la ration fractionnée 1:50. Le programme de surchauffe était de 60 ° C pendant 8 min, 2°C/min à 250°C pendant 20 min. La température de la source MS et de la source quadrapol était respectivement de 230 ° C et 150 ° C, alors que, l'impact du mode d'ionisation était de 70 eV et sur une plage de balayage de 29-550.

L'identification des composés a été réalisée sur la base des indices de rétention GC calculés à partir d'une série d'alcanes injectés dans les mêmes conditions avec l'échantillon, et en comparant les spectres de masse avec ceux de la bibliothèque Wiley 7 NIST 2006.

Le pourcentage relatif des composés de l'huile a été calculé à partir des zones de pic GC.

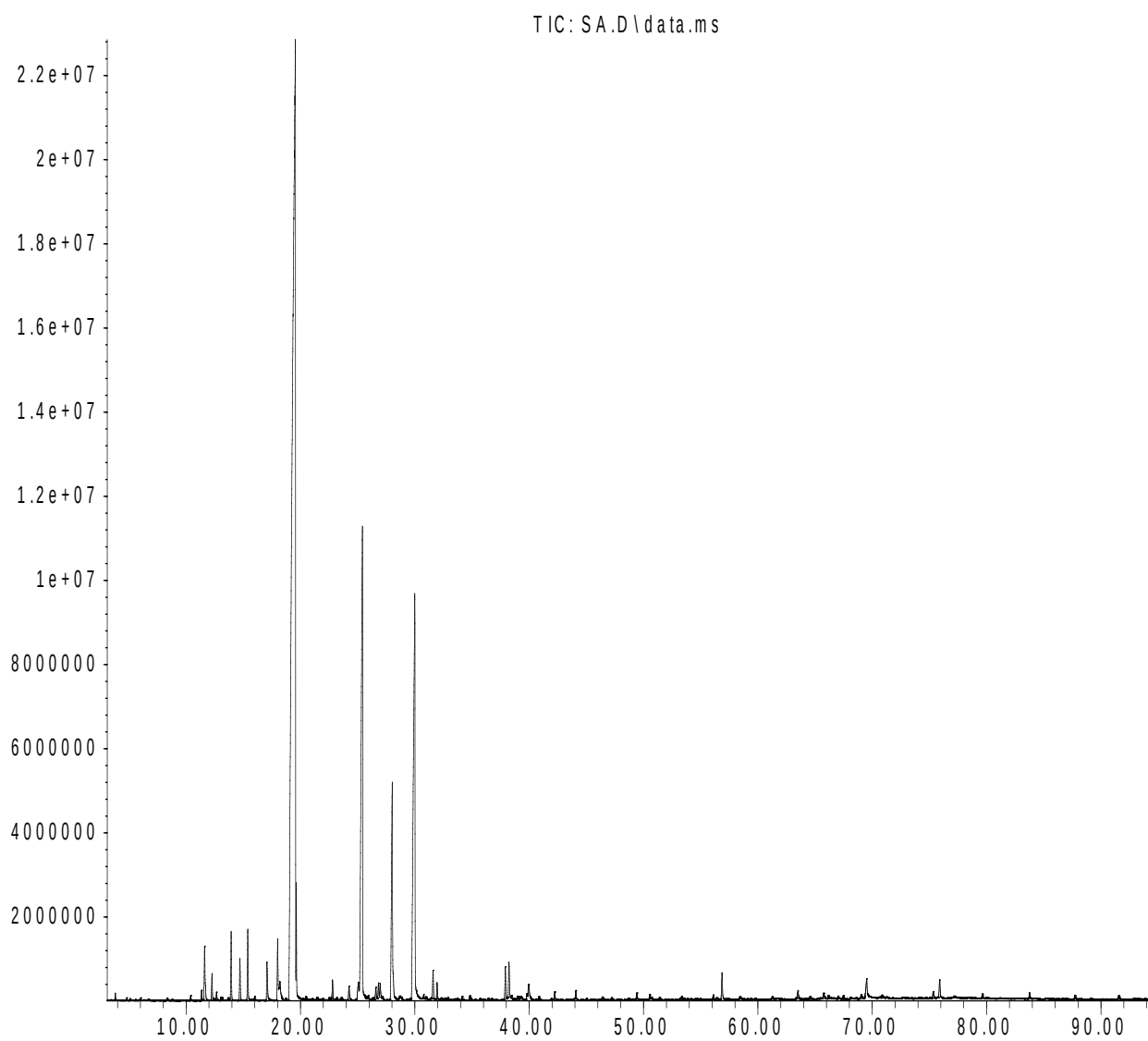
5.2. Résultats

L'analyse quantitative de la composition de l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* a été réalisée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (GCMS).

L'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* par hydro-distillation a permis l'obtention d'une huile de couleur jaune très odorante. Le rendement obtenu pour 100 g de feuilles est de 0,3% (v / w).

La GCMS a permis l'identification de vingt composants représentant 95,44% du total des composants détectés. Les résultats de l'analyse sont représentés dans la **Figure 37** et le **Tableau 10**.

Abundance



Time-->

Figure 37 : Chromatogramme GCMS de l'huile essentielle *S. argel*

Tableau 10 : Identification des données GCMS de l'huile essentielle de *S. argel*

N°	IR ^a	Composés	IR ^b	%GCMS ^c	Identification
1	983	cis-2,6-Dimethyl-2,6-octadiene		0.126	RI, MS
2	1000	trans-2-(2-Pentenyl)furan	1007	0.326	RI, MS
3	1024	D-Limonene	1025	0.903	RI, MS
4	1035	Z- β -Ocimene	1038	0.552	RI, MS
5	1045	E- β -Ocimene	1048	0.949	RI, MS
6	1083	α -Terpinolen	1085	0.885	RI, MS
7	1106	Linalol	1103	57.103	RI, MS
8	1107	1,5,7-Octatrien-3-ol, 3,7-dimethyl-	1104	1.047	RI, MS
9	1173	Terpinene-4-ol	1174	0.245	RI, MS
10	1190	Terpineol	1189	12.954	RI, MS
11	1212	p-Menth-1-en-9-al	1232	0.430	RI, MS
12	1228	Nerol (cis-Geraniol)	1226	4.678	RI, MS
13	1257	trans-Geraniol	1258	12.658	RI, MS
14	1286	Edulan I, dihydro-	1289	0.679	RI, MS
15	1379	β -Damascenone	1382	0.487	RI, MS
16	1449	Geranyl acetone	1452	0.124	RI, MS
17	1480	β -Ionene	1483	0.184	RI, MS
18	1713	Pentadecanal	1713	0.441	RI, MS
19	1844	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	1843	0.21	RI, MS
20	1970	n-Hexadecanoic acid	1970	0.462	RI, MS
% Identification				95.443	
% Composés oxygénés				91,844	
% Composés non-oxygénés				3,599	

^a Indices de rétention donnés dans la littérature (NIST ou Wiley sur colonne capillaire HP-MS ou DB5-MS non polaire).

^b Indices de rétention par rapport aux n-alcanes C5–C28 calculés sur colonne capillaire HP5-MS non polaire.

^c Pourcentage calculé à partir des aires des pics du chromatogramme GC sur la colonne capillaire HP5-MS non polaire.

5.3. Discussion

L'analyse GCMS de l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* a permis l'identification d'une vingtaine de composants. Compte tenu des directives générales (**Bakkali et al., 2008**) indiquant qu'un composant est considéré comme majoritaire s'il représente 20 à 70% des composants présents dans le mélange, le linalol seul peut être considéré comme un composant majoritaire dans la mesure où il représente plus de 57% de la composition de l'huile essentielle de *S. argel*.

De plus, l'analyse RMN de l'huile essentielle de *S. argel* a montré que le composé principal est le linalol. Généralement, ces composants majoritaires déterminent les propriétés biologiques des huiles essentielles (**Bakkali et al., 2008**). Néanmoins, d'autres composants comme le terpinéol (12,954%) et le trans-géraniol (12,658%) représentent plus de 10% du mélange et pourraient participer aux effets biologiques enregistrés.

6. Analyse RMN

6.1. Méthode

L'huile essentielle des feuilles de *S. argel* a également été analysée par RMN. Les spectres RMN de l'huile essentielle de *S. argel* ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 300 (300,13 MHz pour ^1H et 75,47 MHz pour ^{13}C).

Le tétraméthylsilane (TMS) a été utilisé comme étalon interne. Les déplacements chimiques (δ , ppm) décrits pour chaque composé ont été obtenus à température ambiante dans une solution de chloroforme deutéré (CDCl_3).

Des attributions sans équivoque de ^{13}C RMN ont été effectuées à l'aide d'expériences 2D gHSQC et gHMBC (les retards pour les couplages J C / H à une liaison et à une longue portée ont été optimisés pour 145 et 7 Hz, respectivement).

6.2. Résultats et discussion

Le composant majoritaire de l'huile essentielle *S. argel* révélée par l'analyse GCMS est le linalol. Pour confirmer cela, l'huile essentielle a été analysée par spectroscopie RMN. Le ^1H RMN montre clairement les trois groupes méthyle et les protons vinyliques aux déplacements chimiques attendus (**Figure 38**). Dans le système vinylique composé de carbones C-1 et C-2, il est évident que les deux protons liés au carbone C-1 ne sont pas équivalents et apparaissent à δ 5,05 et 5,23 ppm avec des constantes de couplage typiques des protons géminés ($J = \sim 1$ Hz) et une constante de couplage vicinal typique d'une configuration cis ($J = \sim 11$ Hz) et trans ($J = \sim 15$ Hz).

Ces dernières constantes sont le résultat du couplage avec le proton H-2, qui apparaît comme un double doublet à δ 5,91 ppm et permet l'identification du proton H-1_{cis} δ 5,05 ppm et H-1_{trans} 5,23 ppm (**Figure 38**).

Ces identifications pourraient être confirmées par les expériences de RMN bidimensionnelle (COSY et HSQC) (**Figure 39**). Les autres protons pourraient également être détectés par ces expériences, qui ont également permis de confirmer l'attribution du proton H-6 et l'identification des groupes méthyle. Le spectre ^{13}C RMN confirme également la structure du linalol et l'utilisation des spectres HSQC et HMBC a été possible pour identifier les signes les plus pertinents, à partir desquels le carbone C-3 à δ 74 ppm peut être mis en évidence (voir ^{13}C RMN).

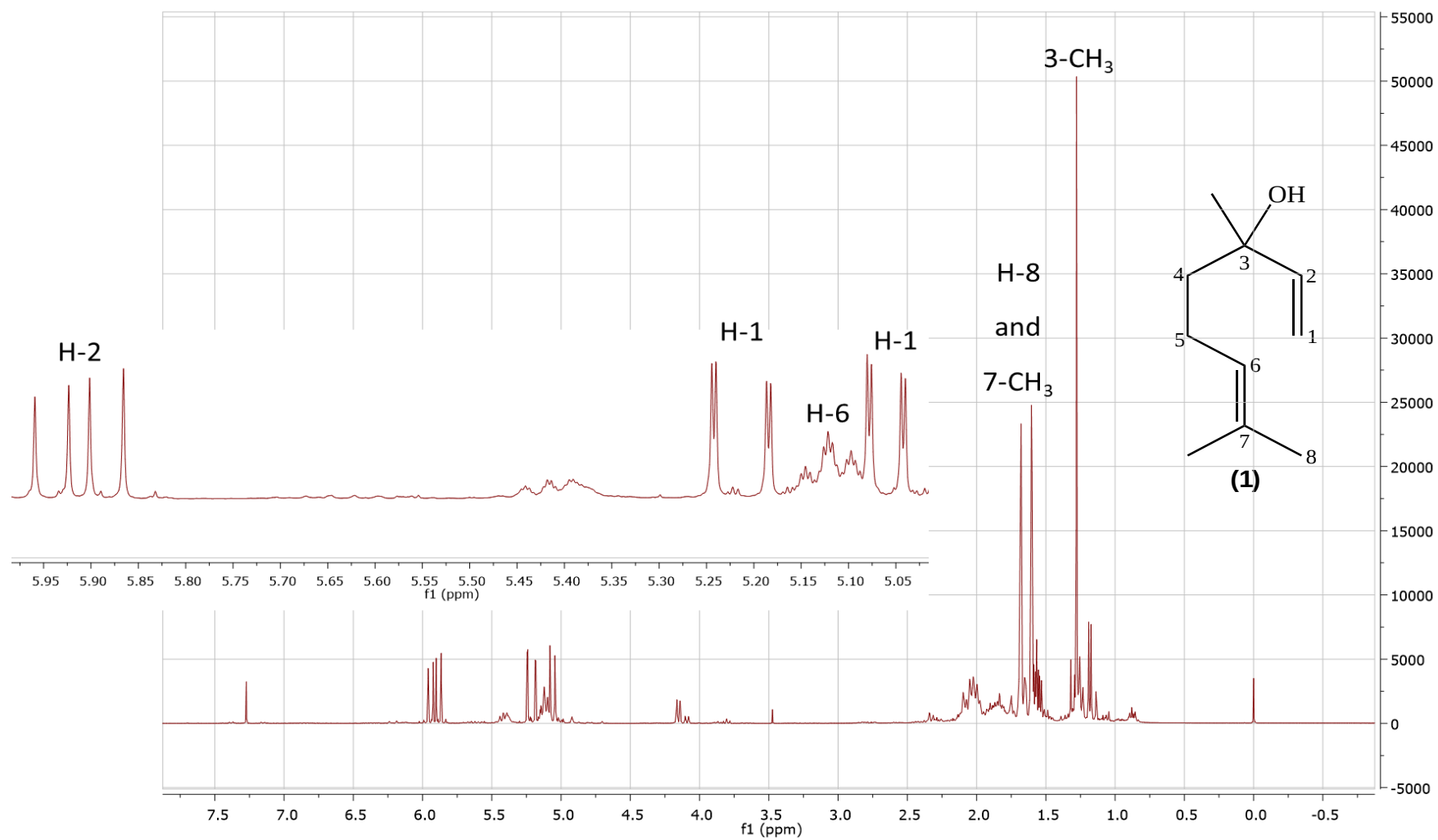


Figure 38 : Spectre RMN ^1H de l'huile essentielle de *S. argel* et structure du Linalol avec numérotation IUPAC

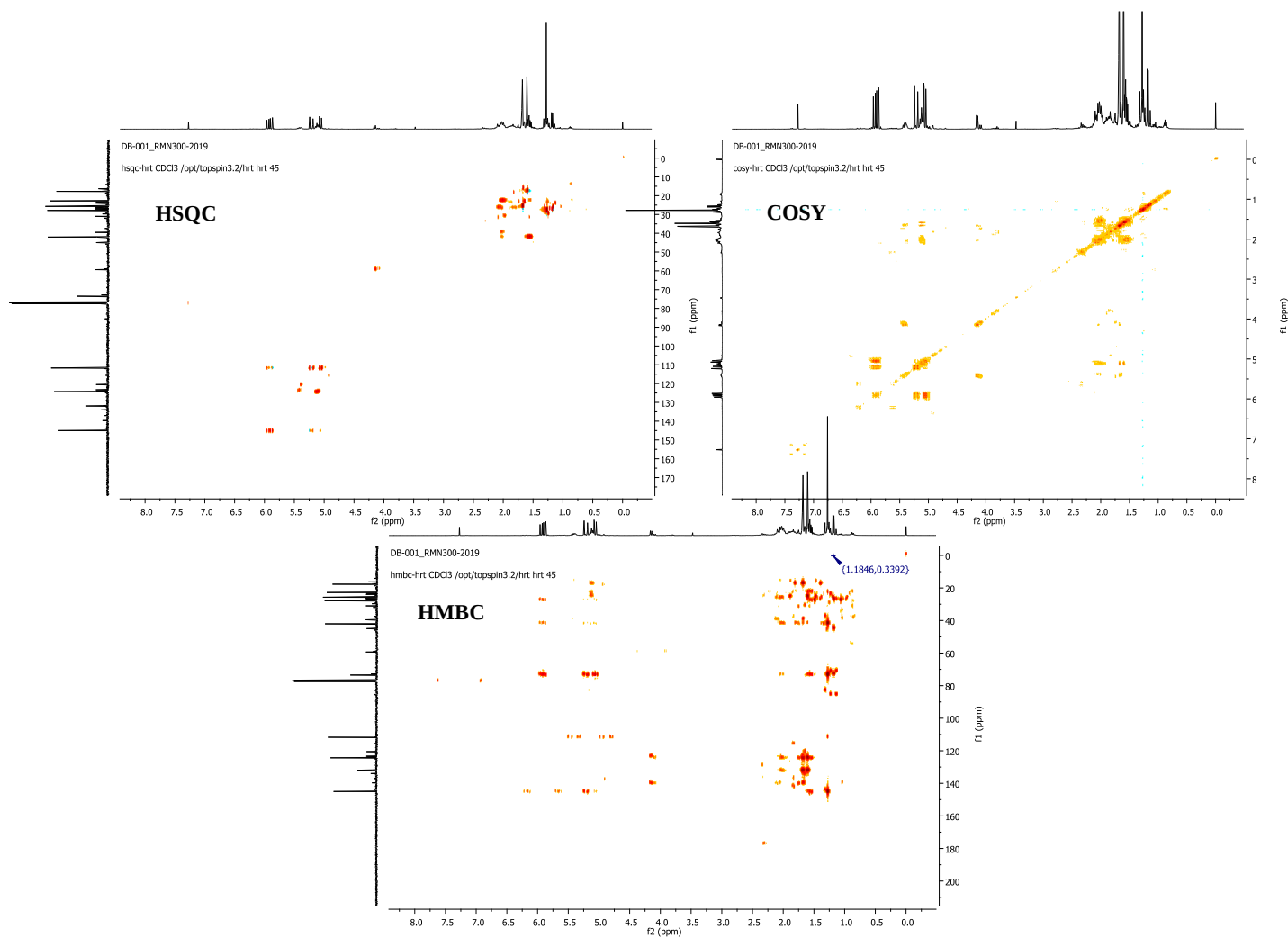


Figure 39 : Spectres RMN bidimensionnelle COSY, HSQC et HMBC de l'huile essentielle de *S. argel*

Etude Toxicologique

Toxicité Orale Aiguë

Etude de la toxicité aigüe

1. Méthode

L'étude de toxicité orale aigüe des différents extraits de *S. argel* a été réalisée conformément aux lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique OCDE-420 (OCDE, 2002). Des rats femelles saines, nullipares et non gravides ont été utilisées pour cette étude. Les rats ont été répartis en treize (13) groupes à raison de cinq sujets par groupe. Une dose unique de chaque extrait (500, 1000 et 2000 mg / kg) a été administrée à des rats mis à jeun pendant la nuit, tandis que le groupe témoin recevait de l'eau distillée (10 ml / kg). Le schéma principal de l'étude est représenté dans la **Figure 40**.

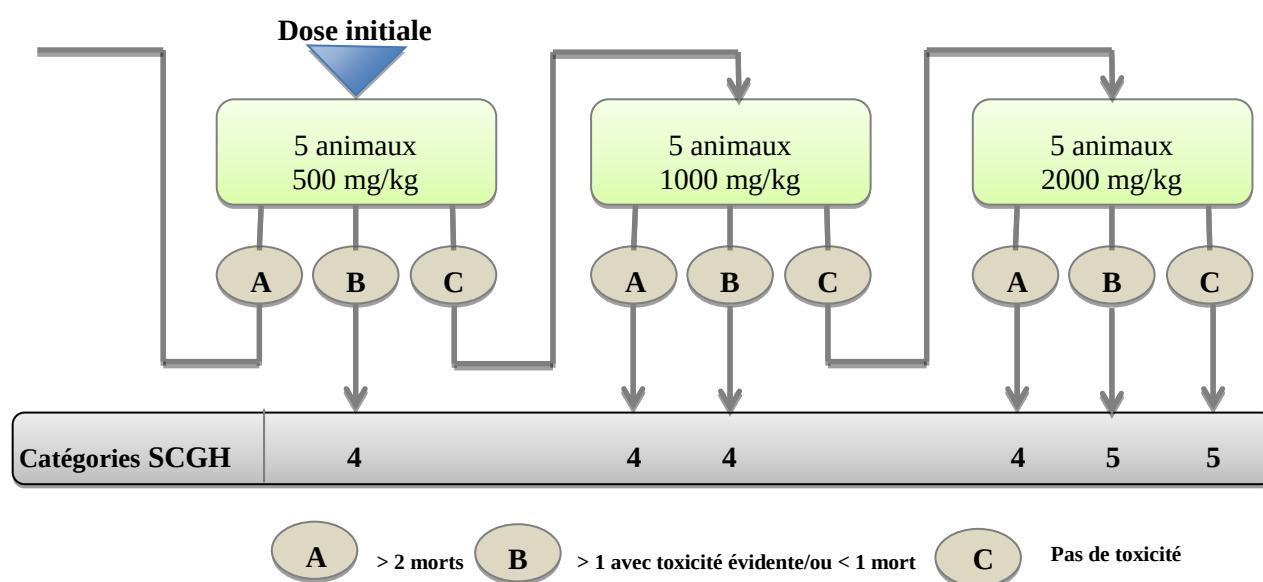


Figure 40 : Schéma principal de l'étude de la toxicité aigüe selon la ligne directive 420 de l'OCDE

Les animaux ont été observés individuellement pendant toute la période expérimentale, pour déceler tout changement comportemental et neurologique traduisant des signes de toxicité aigüe. Pendant 14 jours, les animaux ont été pesés et le nombre de morts a été comptabilisé. Le 14^e jour, des échantillons de sang ont été prélevés afin de mesurer certains paramètres biochimiques, notamment l'urée, la créatinine, l'AST, l'ALT, la phosphatase alcaline, les protéines totales et l'albumine.

2. Etude anatomopathologique

Les animaux ont ensuite été sacrifiés et autopsiés et divers organes (cœurs, foies, reins, poumons et rates) ont été prélevés et pesés en vue de subir une étude histopathologique.

La technique d'analyse histopathologique utilisée est la méthode standard à savoir : une inclusion en paraffine, un passage dans les alcools pour la déshydratation puis la coupe à l'aide du microtome (coupes de 2,5 μm), un séchage et enfin une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine pour le noyau et le cytoplasme. La lecture, l'interprétation et la synthèse sont faites pour chaque cas, selon les doses testées à savoir 500 mg, 1000 mg et 2000 mg.

Enfin, une iconographie rapporte les images caractéristiques reflétant les lésions observées.

3. Résultats

L'évaluation de la toxicité aigüe des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que de l'huile essentielle de *S. argel*, après une administration unique aux doses de 500, 1000 et 2000 mg/kg pendant une période de 15 j, a été réalisée sur la base de l'examen du comportement, de la croissance, des valeurs des paramètres biochimiques mesurés ainsi que sur la base des comptes rendus nécropsiques, accompagnés des examens histologiques qui s'y rattachent.

Lors de l'étude de la toxicité aigüe des extraits et huile essentielle de *S. argel*, aucune mort n'a été signalée pendant l'expérience, néanmoins au niveau du comportement général, les rats sont restés calmes, avec une augmentation du temps de sommeil et une diminution de la vivacité comparativement aux témoins.

Par ailleurs, aucun changement au niveau de la nature des selles, des urines, ni encore moins, des modifications de l'aspect général des rats (pilosité, peau, état des yeux, des oreilles et de la bouche) n'a été enregistré. Les animaux n'ont pas fait d'hématurie, ni de diarrhée, ni de mouvements non coordonnés, ni de dyspnée durant la période d'étude.

De plus, un gain en poids corporel progressif a été constaté chez les rats mis à l'essai pendant toute la durée de l'expérience (**Tableau 11**). Aussi, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les poids des organes comparativement au groupe témoin (**Tableau 12**).

L'analyse des constantes biochimiques a révélé qu'aucune différence significative des niveaux sériques des paramètres testés n'a été observée, comparativement au groupe témoin, excepté pour les valeurs ALT et AST enregistrées chez les rats traités à la dose de 2000 mg/kg par les extraits acétonique (ALT ($p < 0,001$), AST ($p < 0,036$)), méthanolique (ALT (p

<0,0001), AST (p <0,0001)) et aqueux (ALT (p <0,01), AST (p <0,05)) ainsi que par l'huile essentielle (ALT (p <0,002), AST (p <0,002)), respectivement (**Tableau 13**).

A la fin de la période expérimentale, les rats témoins et ceux traités avec les extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* aux différentes doses testées, ont été autopsiés et leur foie, reins, poumons, rate et cœur ont été soumis à un examen histopathologique. L'autopsie a révélé que la taille, la couleur et la forme des différents organes prélevés *in situ* étaient normales. Les prélèvements réalisés au niveau des organes n'ont pas présenté de modifications macroscopiques, ni de lésions de nécrose ischémiques visibles à l'œil nu et pas de foyers suspects d'altérations des tissus.

NB : Les prélèvements ont été faits de façon systématique et ont consisté en trois fragments inclus en totalité.

Les Résultats de nos travaux ont été publiés dans un article novateur intitulé :

"*In vivo* acute toxicity, analgesic activity and phytochemical characterization of *Solenostemma argel* (Del) Hayne essential oil" dans la revue Journal of Applied Biotechnology Reports, en 2023

Tableau 11: Suivi des Poids corporels des rats lors de l’étude de la toxicité aigue des extraits et de l’huile essentielle de *S. argel*

Groupes	Contrôle	Extrait Acétonique			Extrait Méthanolique			Extrait Aqueux			Huile Essentielle		
Dose (mg/kg)	10	500	1000	2000	500	1000	2000	500	1000	2000	500	1000	2000
Poids corporel (g)													
J0	183±1,22	182,8±1,3	183,4±1,14	183,6±1,14	181,6±2,3	183±1,87	182±1	182±1,41	178,6±1,81	179,4±0,89	177,6±1,14	177,6±0,54	178,4±1,14
J7	183,6±4,39	188,4±3,36	182,4±5,41	185,8±2,16	187±2,82	188,6±1,14	185±4,35	181,2±8,78	181±2,12	182,8±4,08	185,6±1,81	186,8±1,30	186±1,58
J14	191,4±2,88	194,2±5,8	191,6±3,78	191±6,36	192,8±4,7	194,2±2,58	179,2±5,93	189±6,59	189,8±2,16	189±7,71	186,8±3,56	193,8±3,56	192,8±4,02

Tableau 12: Poids des organes prélevés lors de l’étude de la toxicité aigue des extraits et de l’huile essentielle de *S. argel*

Groupes	Contrôle	Extrait Acétonique			Extrait Méthanolique			Extrait Aqueux			Huile Essentielle		
Dose (mg/kg)	10	500	1000	2000	500	1000	2000	500	1000	2000	500	1000	2000
Poids des organes (g)													
Foie	6,56±0,47	6,52±0,43	6,72±0,61	6,52±0,7	7,32±0,73	6,84±0,57	6,75±0,53	7,23±0,62	6,36±0,54	7,07±0,55	6,34±0,5	6,1±0,23	6,26±0,37
Rein D	0,54±0,02	0,53±0,02	0,53±0,01	0,58±0,08	0,66±0,04	0,59±0,03	0,59±0,03	0,66±0,07	0,67±0,02	0,68±0,04	0,64±0,06	0,58±0,03	0,61±0,05
Rein G	0,52±0,02	0,51±0,02	0,51±0,0	0,57±0,06	0,67±0,07	0,61±0,03	0,60±0,08	0,68±0,02	0,69±0,04	0,66±0,03	0,63±0,03	0,60±0,03	0,60±0,09
Rate	0,66±0,02	0,63±0,03	0,67±0,07	0,77±0,12	0,50±0,05	0,78±0,09	0,79±0,21	0,63±0,14	0,5±0,16	0,57±0,03	0,43±0,05	0,47±0,06	0,58±0,14
Poumons	1,33±0,32	1,18±0,2	1,05±0,12	1,43±0,35	1,91±0,41	1,58±0,45	1,49±0,42	1,69±0,41	2,02±0,69	1,75±0,13	1,56±0,24	1,8±0,4	1,2±0,29
Cœur	0,64±0,03	0,63±0,02	0,66±0,02	0,57±0,06	0,62±0,07	0,52±0,04	0,53±0,07	0,65±0,1	0,6±0,03	0,66±0,07	0,65±0,06	0,55±0,06	0,61±0,07

Tableau 13 : Résultats des paramètres biochimiques obtenus lors de l'étude de la toxicité aigüe des extraits et de l'huile essentielle de *S. argel*

Groupes	Contrôle	Extrait Acétonique			Extrait Méthanolique			Extrait Aqueux			Huile Essentielle		
Dose (mg/kg)	10	500	1000	2000	500	1000	2000	500	1000	2000	500	1000	2000
Paramètres biochimiques													
Urée	0,44±0,07	0,46±0,16	0,48±0,18	0,49±0,07	0,53±0,07	0,50±0,03	0,51±0,05	0,55±0,04	0,54±0,11	0,46±0,03	0,44±0,06	0,48±0,07	0,46±0,07
Créatinine	11,30±0,38	9,75±1,26	8,65±1,63	9,25±3,98	8,6±0,46	10,58±2,67	8,23±1,57	7,61±0,42	8,3±0,69	8,61±1,27	9,15±1,28	9,39±0,84	8,26±1,71
Acide urique	15,54±1,24	13,47±3,8	10,7±2,64	10,1±0,38	15,7±0,84	15,26±4,95	18,09±9,1	13,33±9,9	18,7±10,4	18,43±8,3	13,03±7,67	20,37±8,6	21,6±8,83
Protéines totales	70,18±1,30	68,42±5,4	63,12±2,6	70,24±5,31	67,9±2,21	64,77±5,86	66,73±4,1	58,6±5,76	59,8±5,84	72,27±4,2	62,05±6,16	56,24±7,48	60,63±8,76
Albumine	31,54±1,71	36,3±7,9	33,7±11,1	31,9±3,14	39,6±2,37	32,21±5,82	33,6±3,06	42,84±9,6	45,5±15,9	38,63±5,5	40,22±4,28	33,24±2,78	34,91±3,16
PAL	133,9±6,92	137,8±9,1	140,5±48,3	166,7±26,2	98,5±18,2	71,48±17,1	129,6±29,3	82,4±28,8	84,7±7,81	74,3±17,04	54,35±19,25	99,82±27,14	101,44±16,9
GOT	62,16±6,4 ^a	66,3±7,88	63,46±12,9	90,5±24,5 ^b	61,5±14,7	84,96±15,8	163,6±49 ^b	108,5±31,2	114,1±27	123,8±41,7 ^b	84,4±18,94	114,76±24,1	146,3±19,4 ^b
GPT	51,7±4,7 ^a	54±4,95	55,05±8,8	70,24±5,3 ^b	65,9±24,31	67,9±16,65	128,3±28 ^b	64,48±17,6	72,7±15,0	91,94±25,3 ^b	68,69±14,71	106,72±45,9	128,3±24,9 ^b
γGT	4,20±0,44	4,51±0,21	4,67±0,5	4,52±0,33	6,47±3,44	3,93±1,91	5,17±1,32	4,86±1,51	4,93±2,85	4,86±3,61	4,86±1,71	2,47±0,21	4,7±1,2
Bilirubine totale	7,30±1,29	7,83±1,21	8,87±1,75	9,58±1,43	7,77±0,22	7,9±0,66	8,13±1,69	5,95±0,34	5,11±2,09	8,13±2,84	6,57±1,57	7,29±3,57	6,49±2,3
Bilirubine directe	4,31±1	4,59±0,9	4,56±0,59	5,05±0,52	4,79±0,22	3,97±0,3	3,52±0,23	3,13±1,01	2,57±1,7	2,77±1,05	1,84±0,55	3,33±2,14	2,85±1,62
Bilirubine indirecte	2,99±0,38	3,23±0,66	4,30±2,16	4,53±1,42	2,98±0,08	3,93±0,55	4,6±1,82	2,82±0,81	2,54±2,27	5,36±1,8	4,72±1,47	3,96±2,32	3,63±1,71

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=5). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey, alors que les chiffres avec des lettres différentes montrent une différence significative (p<0,05).

L'examen histopathologique des organes prélevés sur les rats témoins n'a révélé aucune anomalie lésionnelle (**Figure 41**).

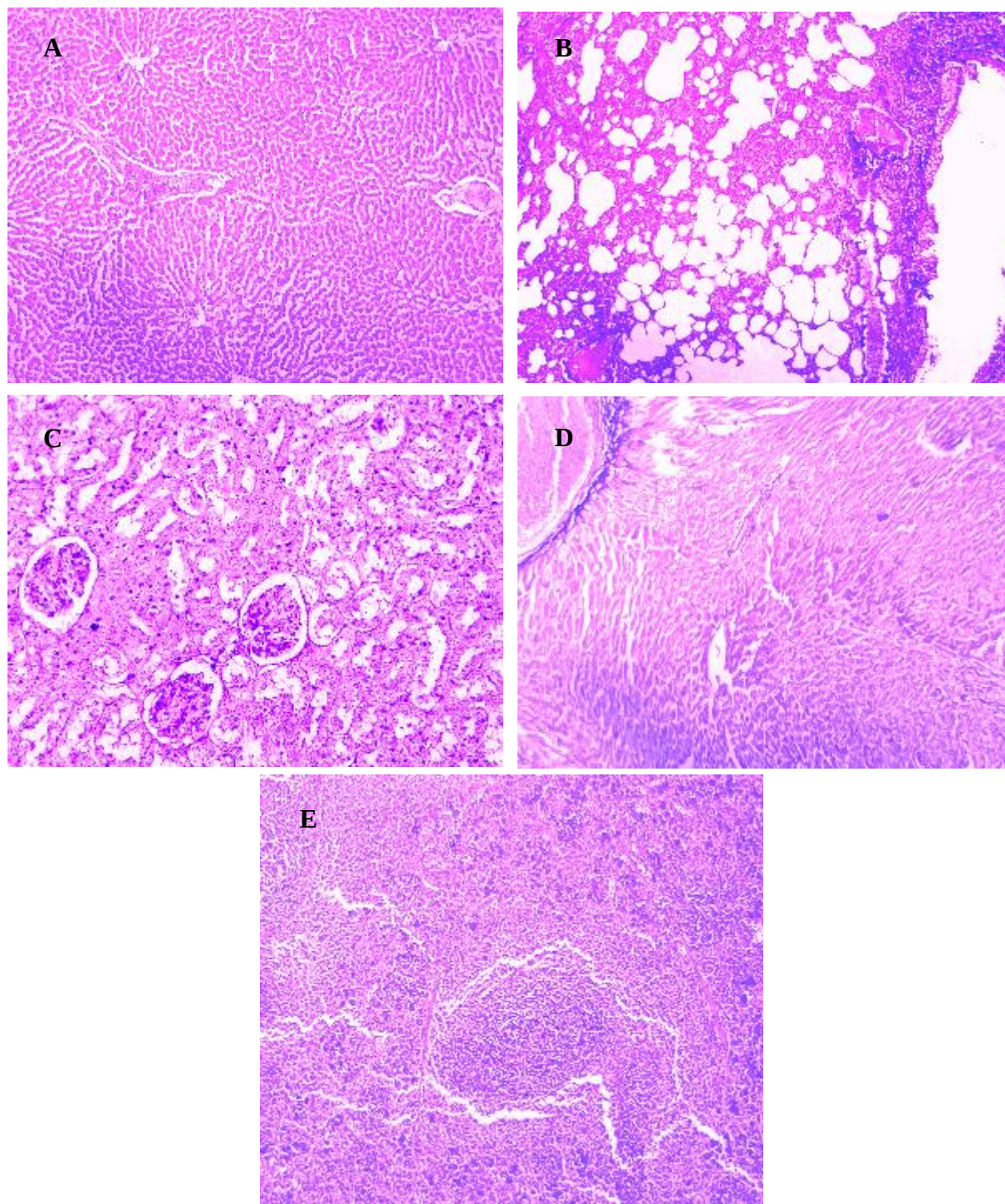


Figure 41 : Microphotographies des organes prélevés du groupe témoin.
Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

A. Foie: parenchyme hépatique normal x10 ; **B.** Poumon: parenchyme pulmonaire normal x10 ; **C.** Rein: parenchyme rénal normal x10 ; **D.** Cœur: parenchyme cardiaque normal x10 ; **E.** Rate: parenchyme splénique normal x10.

Par ailleurs, l'examen microscopique des organes prélevés sur les rats traités par l'extrait acétonique de *S. argel* a permis de mettre en évidence des lésions hépatiques, rénales et pulmonaires. En effet, les lésions hépatiques détectées ne sont apparues qu'à la dose de 1000 mg/kg et sont représentées par une congestion vasculaire des sinusoides et de rares foyers de stéatose sous capsulaire (10 % de parenchyme) (**Figure 42 (B)**), alors qu'à 2000 mg/kg, des lésions dégénératives des foyers de pycnose ont été observées et couvraient 25 % du parenchyme dans 3 cas sur 5 (**Figure 42 (C)**).

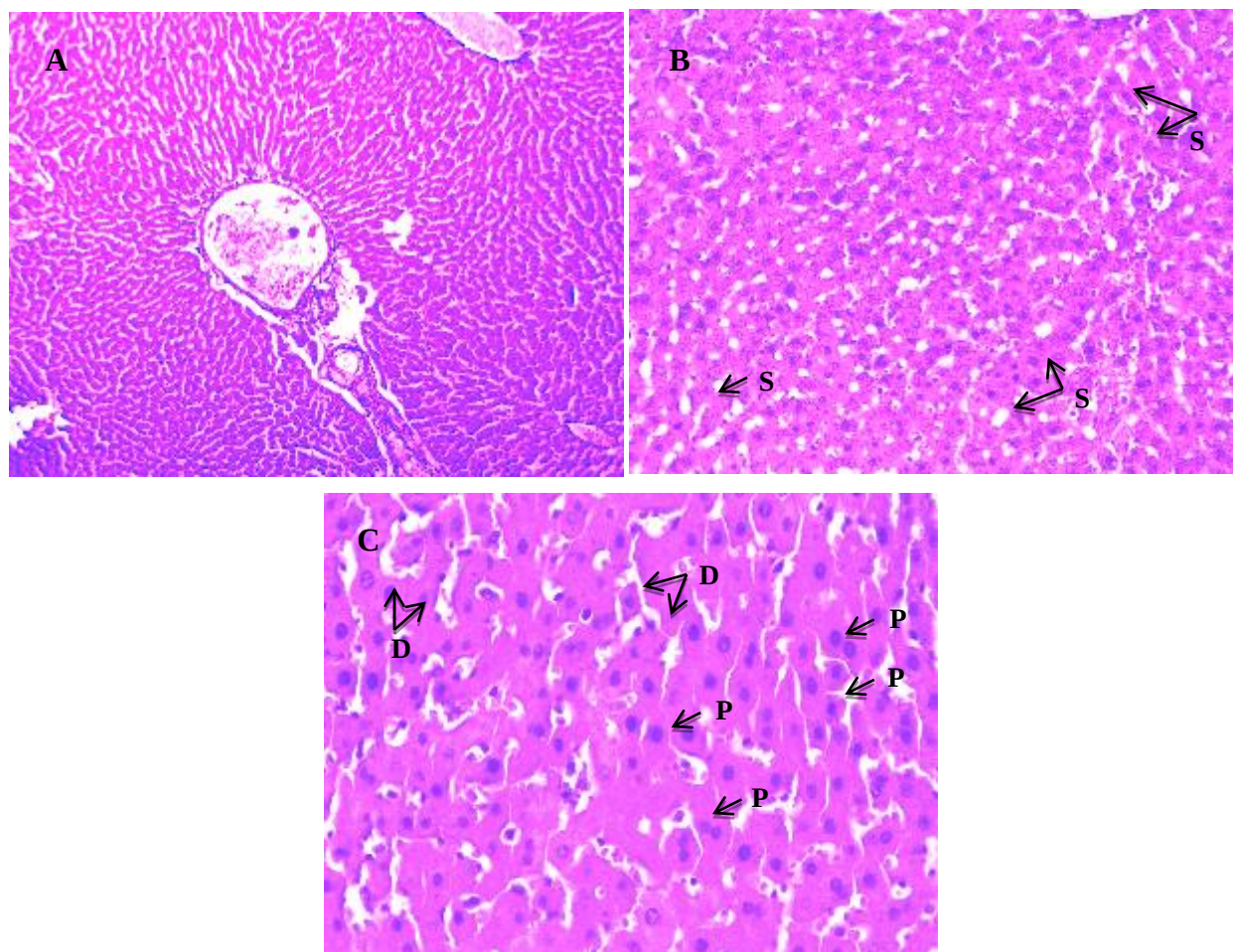


Figure 42 : Microphotographies du foie des rats traités par l'extrait acétonique de *S. argel*. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

A. SAAC 500 mg/kg : parenchyme hépatique normal x20 ; **B. SAAC 1000 mg/kg:** stéatose sous capsulaire x20 ; **C. SAAC 2000 mg/kg:** pycnose et dégénérescence acidophile x40. **S:** Stéatose, **P:** Pycnose, **D:** Dégénérescence cellulaire.

Les lésions rénales ont commencé à apparaître à la dose de 500 mg/kg sous forme de tubulite toxique recouvrant 20 % du parenchyme, observée dans un cas sur cinq (**Figure 43 (A)**). Des lésions plus étendues sont observées aux doses de 1000 et 2000 mg/kg sous forme de tubulite

avec hypercellularité mésangiale couvrant près de 25 % du parenchyme dans trois cas sur cinq (**Figure 43 (B), (C)**).

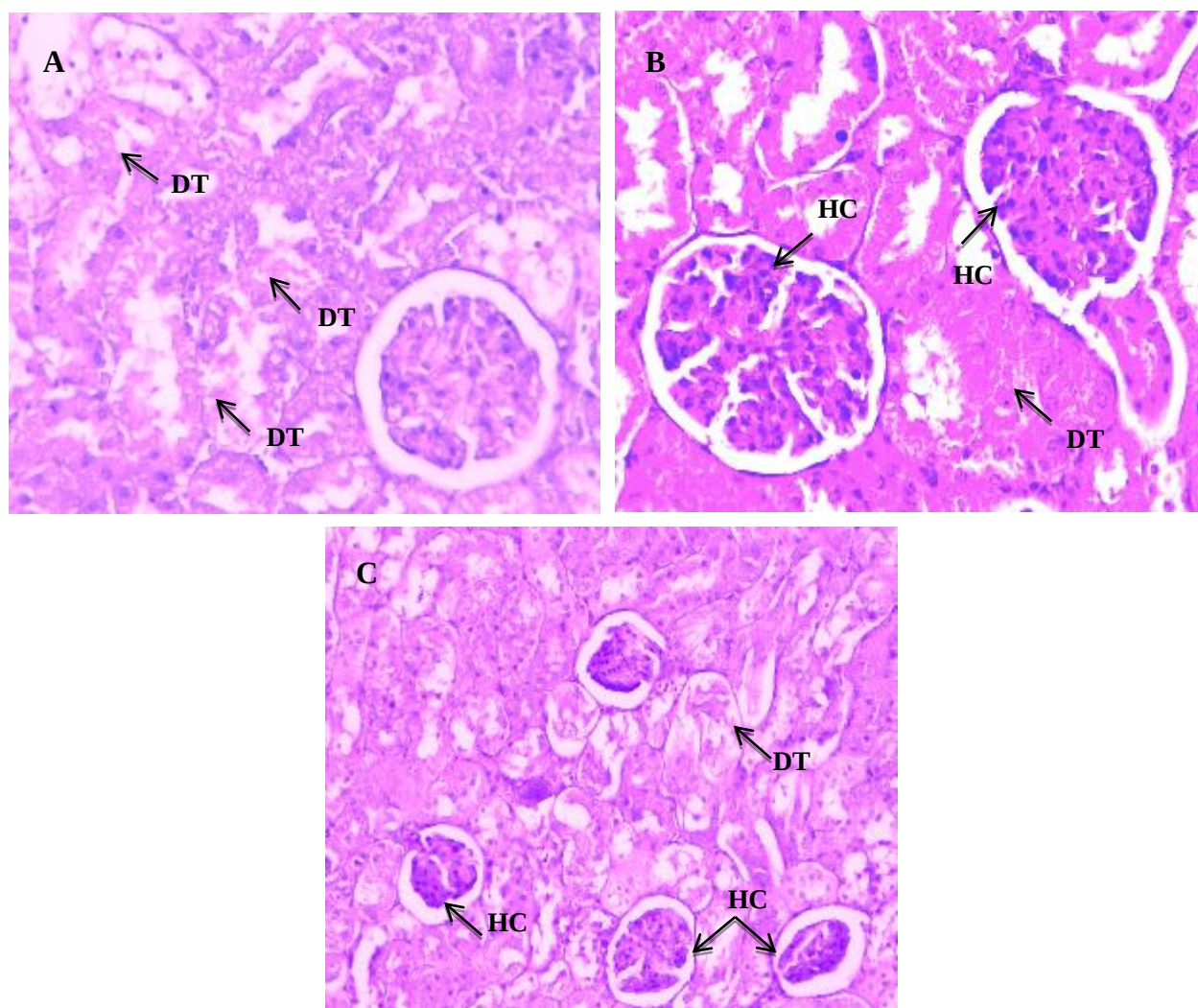


Figure 43 : Microphotographies des reins des rats traités par l'extrait acétonique de *S. argel*. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

A. SAAC 500 mg/kg: Dégénérescence tubulaire x40 ; **B. SAAC 1000 mg/kg:** Dégénérescence tubulaire avec hypercellularité mésangiale du floculus x40 ; **C. SAAC 2000 mg/kg:** Dégénérescence tubulaire avec hypercellularité mésangiale x20. **DT:** Dégénérescence tubulaire, **HC:** Hypercellularité.

De plus, l'examen histopathologique des poumons a révélé des lésions pulmonaires de type alvéolite aux doses de 500 mg/kg, 1000 mg/kg et 2000 mg/kg couvrant 25 % du parenchyme. La fréquence d'apparition de ces lésions varie selon les doses administrées, ainsi, elle est d'un cas sur cinq à la dose de 500 mg kg, de deux cas sur cinq à la dose de 1000 mg/kg et de cinq cas sur cinq à une dose de 2000 mg/kg (**Figure 44**).

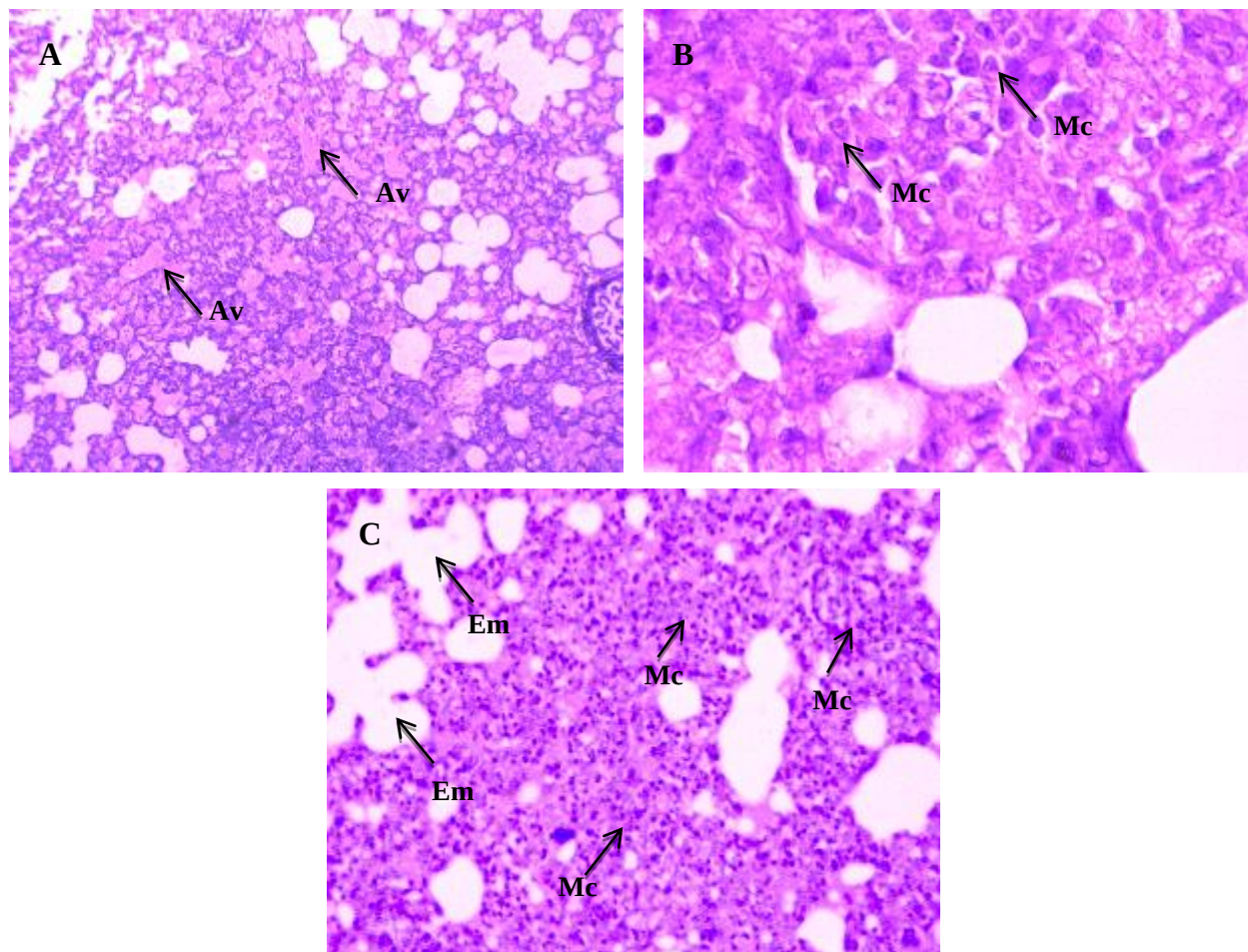


Figure 44 : Microphotographies des poumons des rats traités par l'extrait acétonique de *S. argel*. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

A. SAAC 500 mg/kg: Alvéolite x10 ; **B. SAAC 1000 mg/kg:** Alvéolite macrophagique x40 ; **C. SAAC 2000 mg/kg:** Alvéolite macrophagique et emphysème x10. **Av:** Alvéolite, **Mc:** Macrophages, **Em:** Emphysème.

Enfin, l'examen histopathologique de la rate et du cœur n'a révélé aucune lésion toxique chez les rats traités à l'extrait acétonique de *S. argel*.

D'autre part, l'examen histopathologique des organes des rats traités par l'extrait méthanolique de *S. argel* a révélé des lésions hépatiques et pulmonaires allant crescendo en sévérité en fonction des doses testées. Les lésions hépatiques observées consistaient en une légère congestion vasculaire à la dose de 500 mg/kg (**Figure 45 (A)**), une dilatation sinusoïdale des veines centrolobulaires à la dose de 1000 mg/kg (**Figure 45 (B)**) et la présence d'une dilatation des veines centrolobulaires avec ectasie des sinusoïdes et une pycnose de certaines cellules en foyer à la dose de 2000 mg/kg (**Figure 45 (C)**).

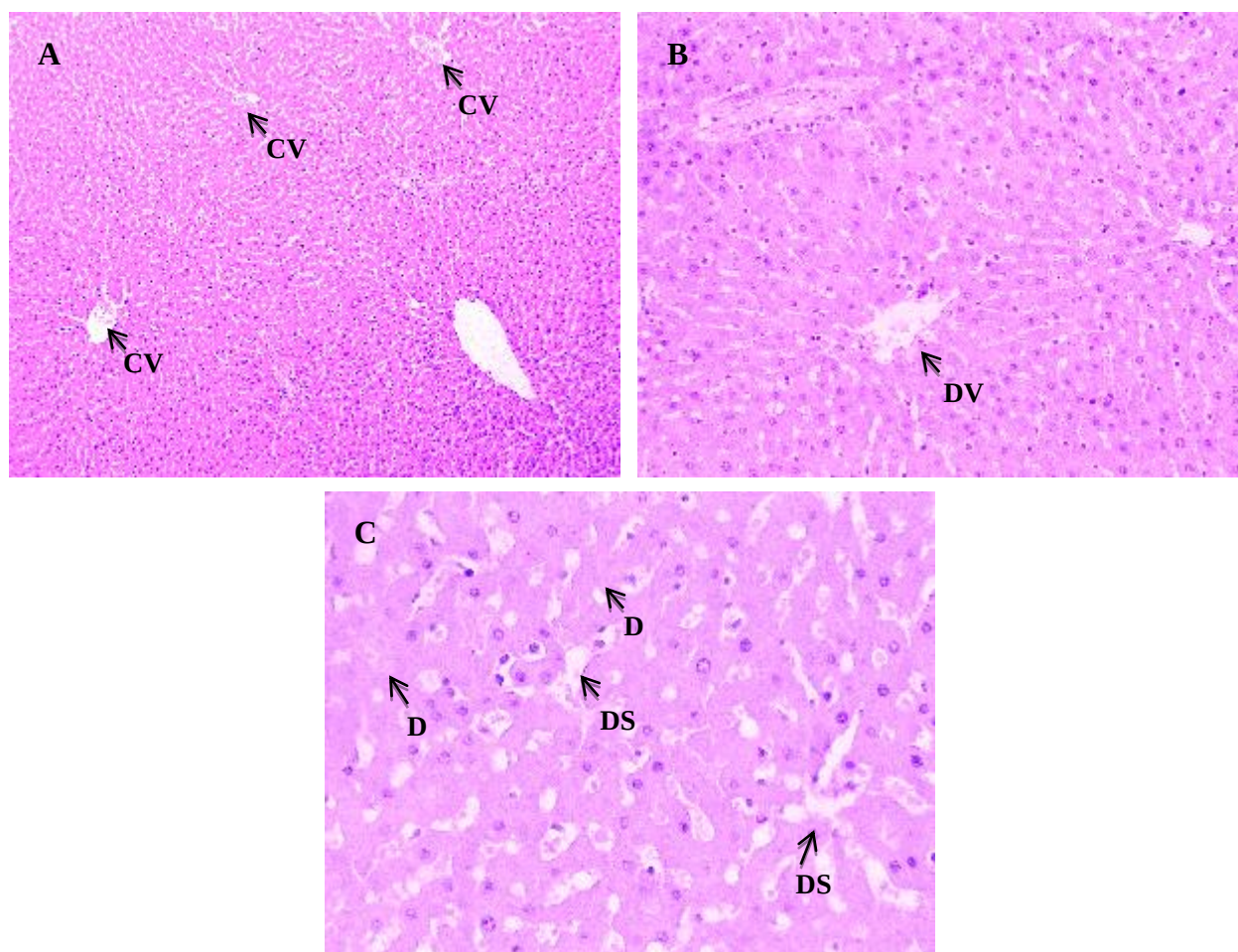


Figure 45 : Microphotographies du foie des rats traités par l'extrait méthanolique de *S. argel*. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

A. SAME 500 mg/kg: parenchyme hépatique normal x4 ; **B. SAME 1000 mg/kg:** stéatose sous capsulaire x4 ; **C. SAME 2000 mg/kg:** pycnose et dégénérescence acidophile x25.
CV: Congestion vasculaire, **DV:** Dilatation vasculaire, **DS:** Dilatation sinusoidale, **D:** Dégénérescence cellulaire.

Par ailleurs, l'examen microscopique du parenchyme pulmonaire a permis de mettre en évidence des lésions pulmonaires allant de discrètes lésions d'emphysème à la dose de 500 mg/kg à des lésions à type d'emphysème diffus à la dose de 1000 mg/kg (**Figure 46 (A), (B)**). De plus, une prédominance de lésions emphysémateuses avec rupture des septats périphériques associées à des lésions macrophagiques sous forme d'amas de cellules histiocytaires et lymphocytaires témoignant d'une inflammation ainsi que des lésions de dégénérescence cellulaire en péri-lobulaire ont été révélées à la dose de 2000 mg/kg (**Figure 46 (C)**).

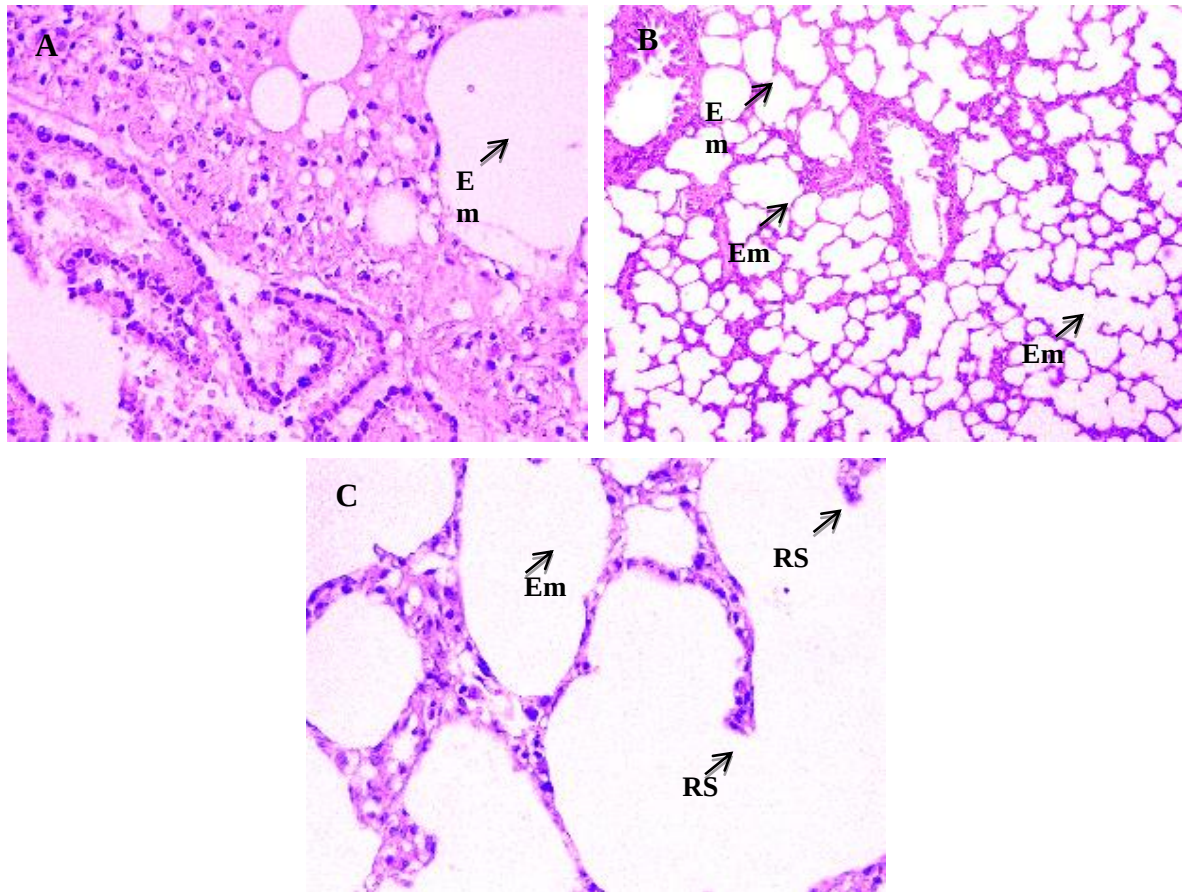


Figure 46 : Microphotographies des poumons des rats traités par l'extrait méthanolique de *S. argel*. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

A. SAME 500 mg/kg: Emphysème localisé en bulle x25 ; **B. SAME 1000 mg/kg:** Emphysème diffus x4 ; **C. SAAC 2000 mg/kg:** Emphysème diffus avec rupture des septats alvéolaires x40. **RS:** Rupture des septats, **Em:** Emphysème.

D'autre part, l'examen histopathologique des reins a montré des lésions de dégénérescence des tubes rénaux sans lésions des glomérules uniquement chez les rats recevant la dose de 2000 mg/kg (**Figure 47**). Enfin, aucune anomalie lésionnelle n'a été révélée au niveau du cœur et de la rate à toutes les doses testées.

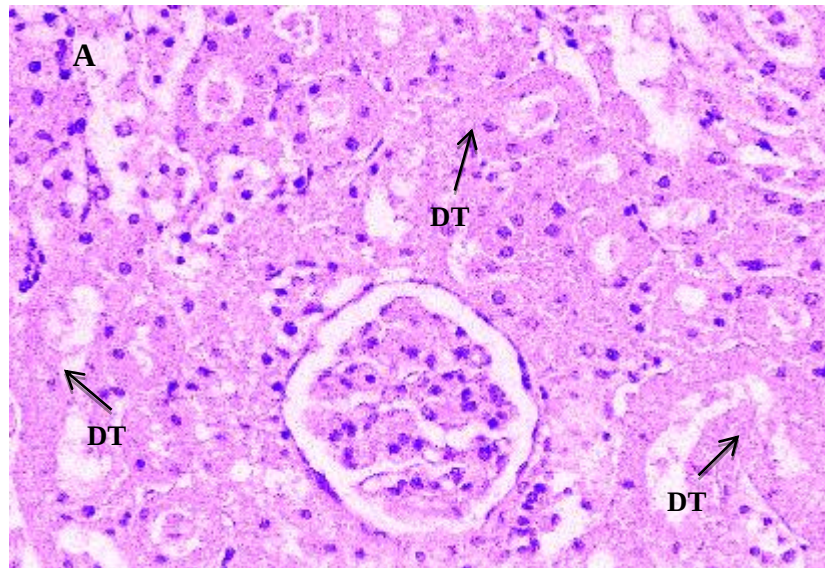


Figure 47 : Microphotographies des reins des rats traités par l'extrait méthanolique de *S. argel*. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

A. SAME 2000 mg/kg: Dégénérescence tubulaire sans lésions glomérulaires x10.
DT: Dégénérescence tubulaire.

L'examen histopathologique des organes prélevés sur les rats traités par l'extrait aqueux lyophilisé des feuilles de *S. argel*, a mis en évidence des lésions intéressantes essentiellement le foie et les poumons. Les lésions hépatiques observées se traduisaient par des stases vasculaires au niveau des veines centrolobulaires et des sinusoides. Ces lésions étaient graduellement progressives, nulles à 500 mg/kg, modérées à 1000 mg/kg (**Figure 48 (B)**) mais avec une répercussion au niveau des hépatocytes sous forme de dégénérescence cellulaire à 2000 mg/kg (**Figure 48 (C)**).

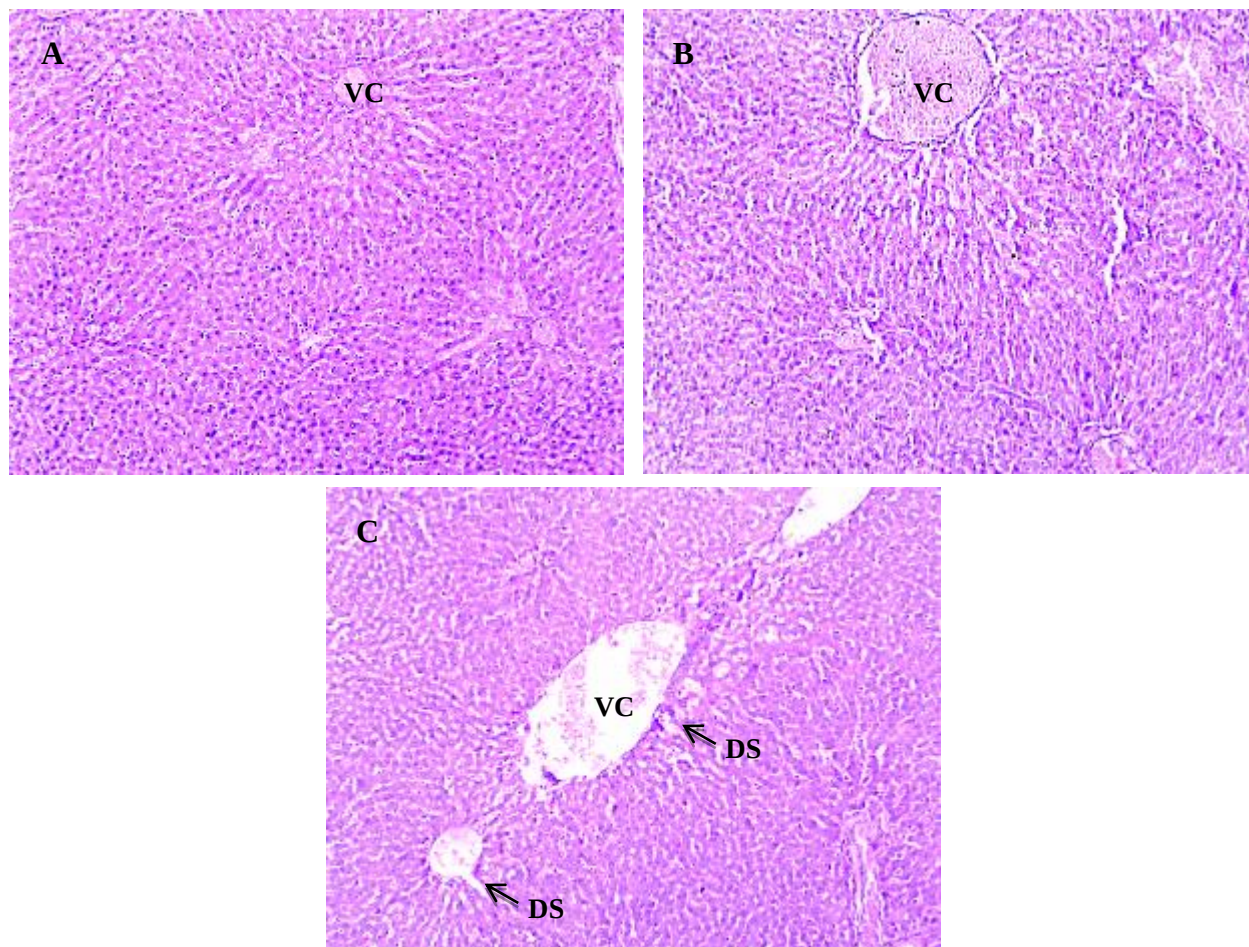


Figure 48 : Microphotographies du foie des rats traités par l'extrait aqueux lyophilisé de *S. argel*. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

A. SAAQ 500 mg/kg: parenchyme hépatique normal $\times 10$; **B. SAAQ 1000 mg/kg:** dilatation des veines centrolobulaires $\times 10$; **C. SAAQ 2000 mg/kg:** stase vasculaire et dilatation des sinusoides $\times 10$. **CV:** Veine centrolobulaire, **DS:** Dilatation sinusoidale.

Au niveau du parenchyme pulmonaire, des dilatations des cavités alvéolaires avec ruptures des septats ont été mises en évidence surtout dans les zones périphériques et de façon inégale selon les doses testées. En effet, les foyers emphysémateux n'apparaissent qu'à la dose de 1000 mg/kg pour s'accroître à la dose de 2000 mg/kg (**Figure 49 (B), (C)**).

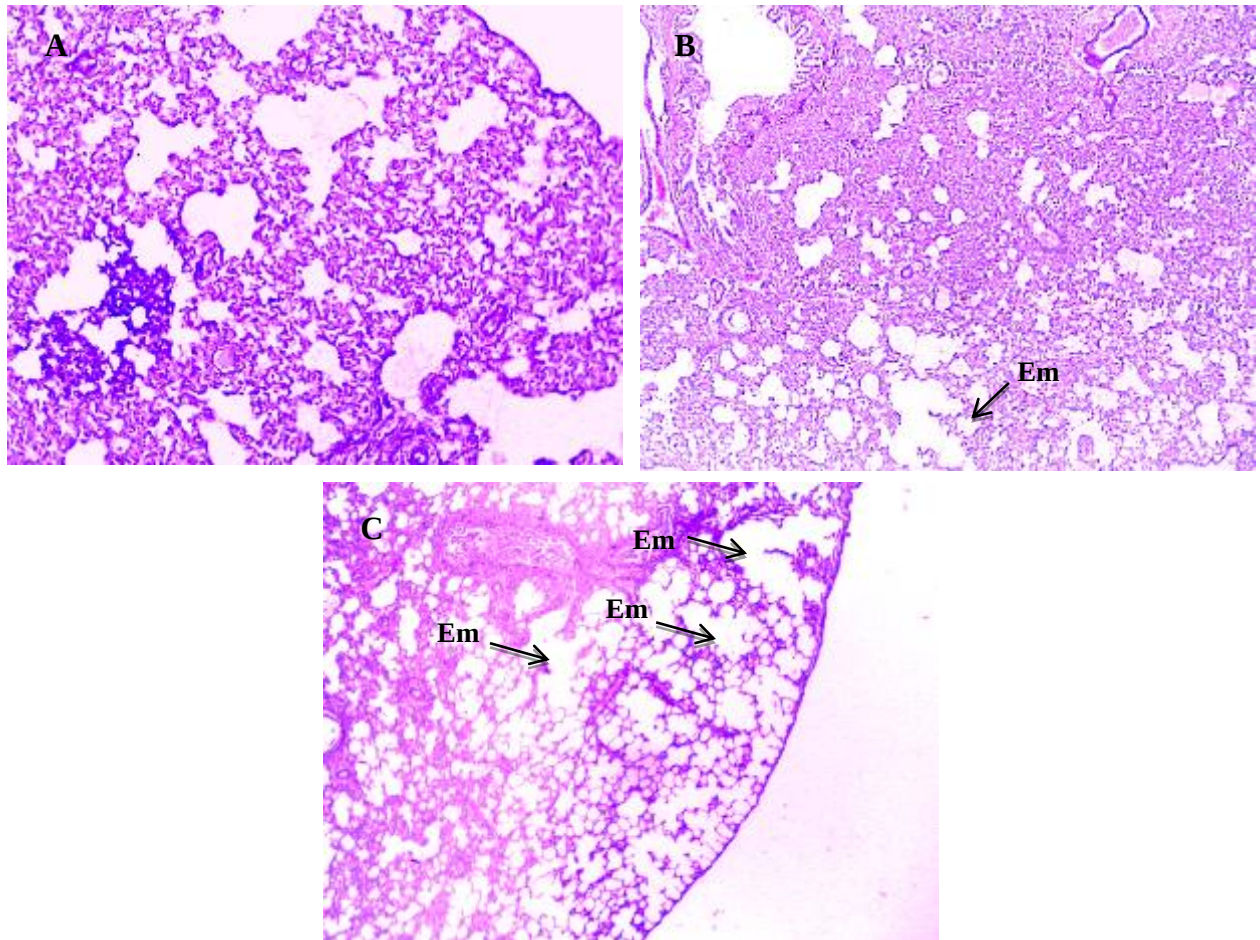


Figure 49: Microphotographies des poumons des rats traités par l'extrait aqueux lyophilisé de *S. argel*. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

A. SAME 500 mg/kg: Aspect subnormal x10 ; **B. SAME 1000 mg/kg:** Emphysème en foyer x10 ; **C. SAAC 2000 mg/kg:** Emphysème diffus périphérique x10. **Em:** Emphysème.

Par ailleurs, une métaplasie myéloïde a été observée au niveau de la rate aux différentes doses testées, ce phénomène pourrait être lié à un déficit de la moelle osseuse (**Figure 50**). Enfin, le parenchyme rénal et les faisceaux musculaires cardiaques ne présentaient aucune anomalie lésionnelle même aux fortes doses testées.

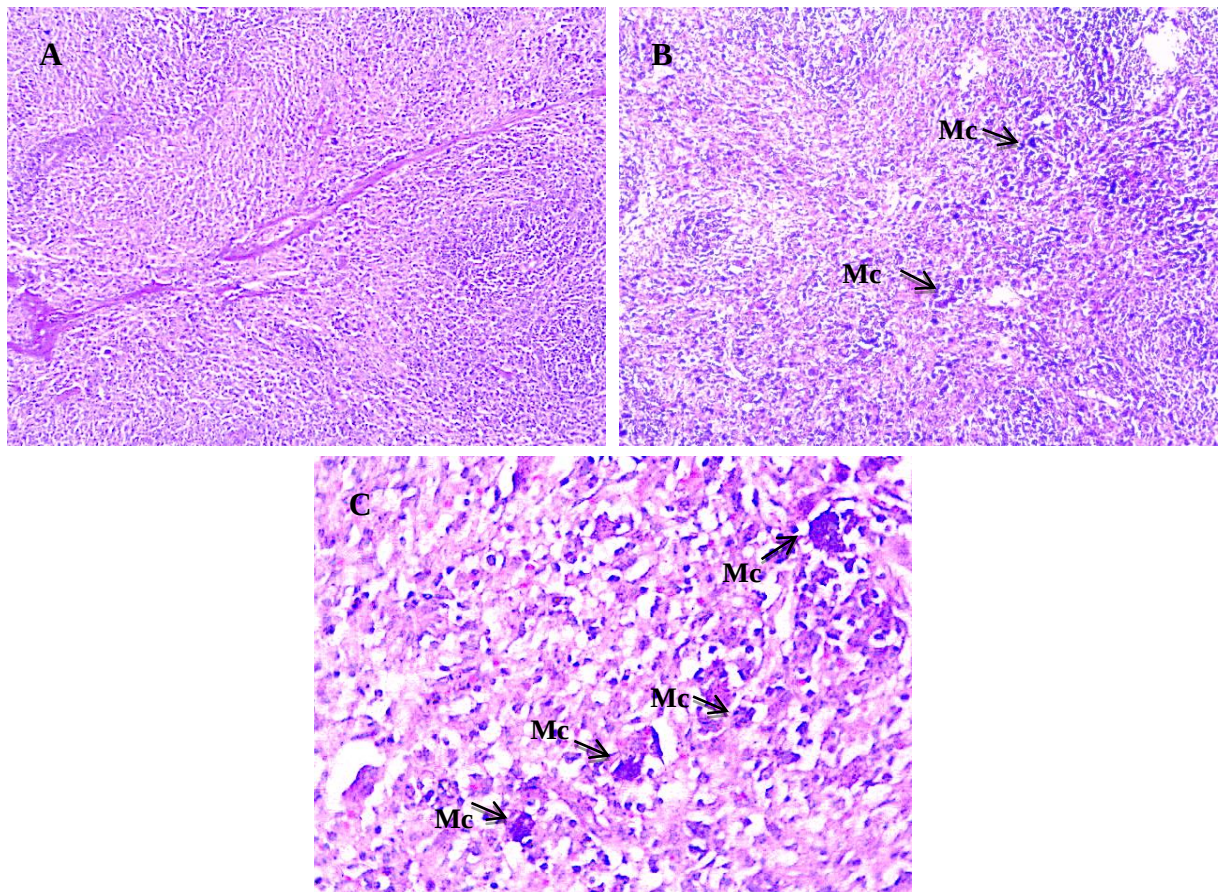


Figure 50 : Microphotographies du parenchyme splénique des rats traités par l'extrait aqueux lyophilisé de *S. argel*. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

A. SAME 500 mg/kg: Discrète métaplasie myéloïde x10 ; **B. SAME 1000 mg/kg:** Métaplasie myéloïde x10 ; **C. SAAC 2000 mg/kg:** Métaplasie splénique avec métacaryocytes nombreux x20. **Mc:** Métacaryocytes.

L'examen microscopique des organes prélevés chez les rats traités par l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* a révélé des lésions hépatiques et pulmonaires.

En effet, les lésions hépatiques détectées n'apparaissent qu'à la dose de 2000 mg/kg et sont représentées par une stase veineuse légère et focale (**Figure 51 (A)**).

De plus, l'examen histopathologique des poumons a révélé des lésions pulmonaires discrètes et légères sous forme d'alvéolite œdémateuse et d'emphysème périphérique, observées aux doses de 1000 et 2000 mg/kg (**Figure 51 (B), (C)**). Enfin, l'examen histopathologique des reins, de la rate et du cœur n'a révélé aucune lésion toxique pour toutes les doses testées.

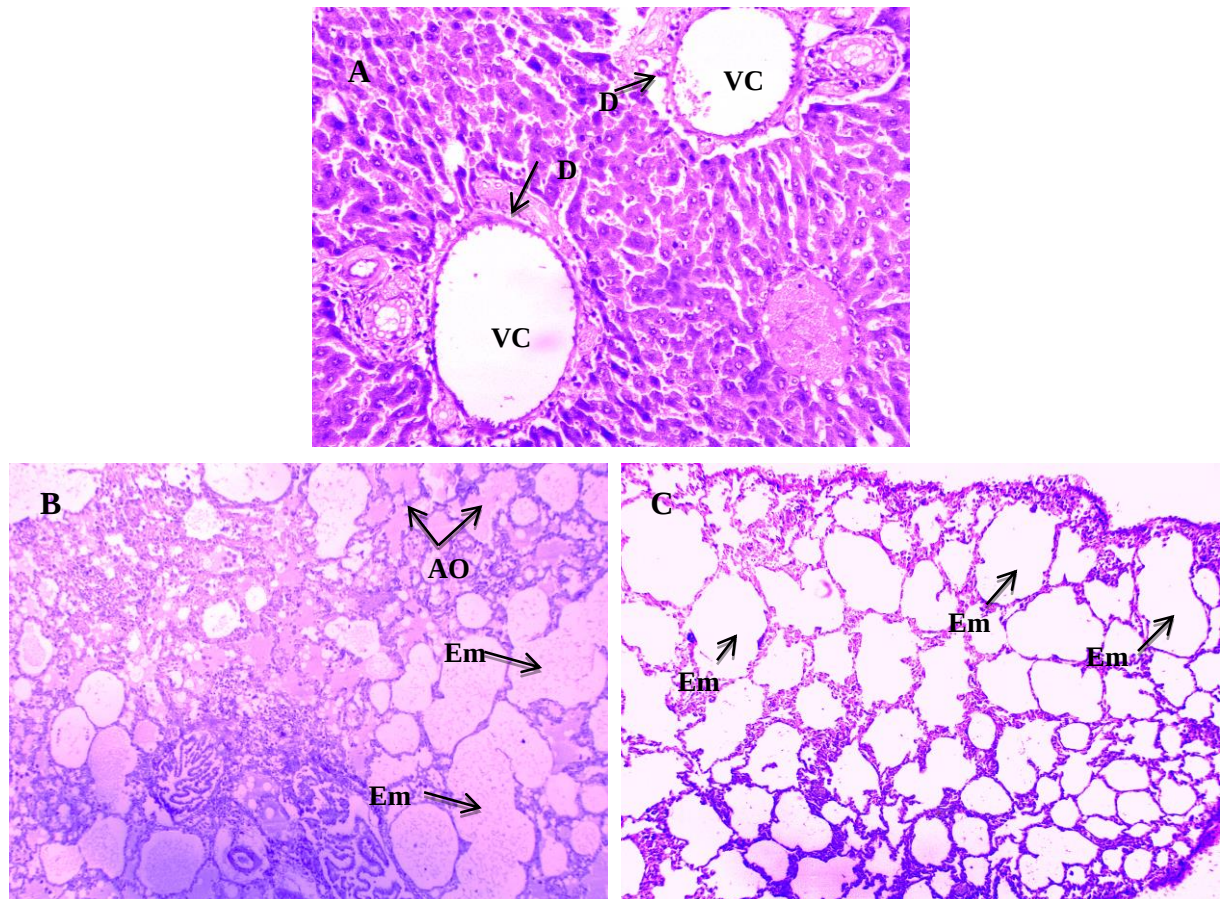


Figure 51 : Microphotographies du foie et des poumons des rats traités par l'huile essentielle de *S. argel*. Coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline/Eosine (H/E).

1. Foie: A. SAHE 2000 mg/kg: Foyers de dilatation centrolobulaire x10 ; **2. Poumons: B. SAME 1000 mg/kg:** Emphysème en foyer x10 ; **C. SAAC 2000 mg/kg:** Emphysème périphérique x10. **D:** Dilatation, **VC:** Veine Centrolobulaire, **Em:** Emphysème, **AO:** Alvéolite œdémateuse.

4. Discussion

L'évaluation de la toxicité aiguë a été menée dans le but de déterminer les éventuels effets toxiques pouvant survenir après une administration orale unique des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel*, ainsi que de son huile essentielle.

Aucun signe de morbidité ou de mortalité n'a été observé tout au long de la durée de l'expérience aux concentrations testées pour les extraits et huile essentielle de *S. argel*, ce qui indique que ces extraits ont été bien tolérés par les rats. Selon le système de classification globalement harmonisé de l'OCDE (**SGH, 2013**), les extraits et l'huile essentielle testés peuvent être classés dans la catégorie 5 et considérés comme des substances non toxiques par voie orale.

Par ailleurs, le comportement général et le poids corporel sont des paramètres critiques pour l'évaluation des premiers signes de toxicité (**Sireeratawong et al., 2008**). Le suivi hebdomadaire de la masse pondérale durant la période du test de toxicité aiguë de *S. argel* a décelé un gain en poids progressif des rats mis à l'essai. Ceci peut être attribué à la croissance normale des rats avec l'âge ou à l'amélioration de la consommation d'aliments par les rats.

Dans la présente étude, aucune altération des paramètres biochimiques n'a été observée après le traitement par les extraits et l'huile essentielle de *S. argel* à l'exception des paramètres ALT et AST enregistrés chez les rats traités à la dose de 2000 mg/kg. Des niveaux augmentés d'ALT et d'AST peuvent être la conséquence d'une toxicité hépatique. En effet, les enzymes hépatiques, bio-marqueurs sériques, sont généralement les paramètres biochimiques dosés afin d'évaluer les effets toxiques sur le foie (**Mukinda et Syce, 2007**). Les augmentations des taux d'AST et d'ALT dans le sérum sont associées à une toxicité hépatique par des médicaments ou toute autre hépatotoxine (**Ramaiah, 2011**). L'augmentation de l'activité des aminotransférases (AST et ALT) traduit une cytolysé hépatique. Cependant, l'ALT est plus spécifique au foie que l'AST et par conséquent, c'est un meilleur paramètre pour détecter des lésions hépatiques. En plus du foie, l'AST est également associée à des maladies d'autres organes tels que le cœur et le muscle (**Ozer et al., 2008**).

L'évaluation des changements pathologiques dans les organes des animaux traités, à la fois macroscopiquement et microscopiquement, est la base d'une évaluation de la sécurité (**Prabu et al., 2013**). L'examen macroscopique des rats traités aux extraits et à l'huile essentielle de

S.argel, à toutes les doses testées, n'a révélé aucun changement dans les organes vitaux et reproducteurs au cours de l'analyse qualitative. Lors de l'examen histologique, aucune aberration grave dans l'intégrité structurelle des organes étudiés n'a été enregistrée après administration des extraits acétonique, méthanolique et aqueux à la dose de 500 mg/kg de poids corporel. Cependant, leur administration aux doses de 1000 mg/kg et 2000 mg/kg a entraîné des modifications pathologiques au niveau du foie, des reins et des poumons. Par ailleurs, l'examen microscopique des organes des rats traités par l'huile essentielle de *S.argel* a permis de mettre en évidence des lésions discrètes au niveau du foie uniquement chez les rats ayant reçu l'huile à la dose de 2000 mg/kg et des lésions pulmonaires minimales aux doses de 1000 et 2000 mg/kg.

4. Conclusion

Les résultats obtenus démontrent une toxicité orale possible des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S.argel*, ainsi que de son huile essentielle aux doses élevées de 1000 mg/kg et 2000 mg/kg.

Activité Cytotoxique

Activité cytotoxique

1. Méthode

Le test de cytotoxicité a été réalisé selon la méthode décrite par **Meyer et al., 1982**. Pour cela, des œufs d'*Artemia salina* ont été élevés à l'abri de la lumière, dans un système contenant de l'eau de mer artificielle. Au bout de 24h, les œufs ont commencé à éclore et des larves de crevettes de saumure appelées nauplii sont apparues et ont été collectées à l'aide d'une pipette. Par la suite, une solution mère de chaque extrait de *S. argel* ainsi que du contrôle positif ;le bichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) a été préparée en dissolvant 20 mg de la substance à tester dans 2 ml de DMSO. Puis, dix larves d'*Artemia salina* ont été transférées dans des flacons contenant un volume final de 5 mL avec une gamme de dilution de 1000, 800, 600, 400, 200, 100 et 10 µg/ml pour chaque substance à tester. Le contrôle négatif est additionné de 500 µl de DMSO.

24 à 48h plus tard, les larves ont été comptées et le nombre de survivants a été enregistré pour chaque concentration testée. L'expérience a été réalisée en triplicatas au cours de trois tests successifs.

Afin d'estimer la CL50 (Concentration létale de 50% des nauplii d'*Artemia salina*) des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) ainsi que celle de l'huile essentielle (SAHE) de *S. argel*, la transformation en probits des pourcentages des mortalités corrigées (**Cavelier, 1976**), ainsi que celle des logarithmes décimaux des doses testées ont été réalisés (**Cavelier, 1976**). Ces transformations ont permis d'établir des équations des courbes de régressions « probit – logarithmes ».

A partir des équations, les concentrations létales 50 (CL50) de chacun des extraits et l'huile essentielle ont été calculées en remplaçant « y » par le probit 50 (5). Les CL50 peuvent être déterminées graphiquement en recherchant l'abscisse du point correspondant au probit 5 sur le graphe (**Cavelier, 1976**).

2. Résultats

L'évaluation de l'activité cytotoxique des extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* a été réalisée sur des nauplii d'*Artemia salina*. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 14** sous forme de moyenne arithmétique $\pm$ l'écart-type des taux de mortalité enregistrés pour chaque groupe. Le **tableau 14** présente aussi les

résultats de la comparaison multiple par le test de Tukey entre les différents lots ainsi que les valeurs de CL₅₀ obtenues.

Tableau 14 : Taux de mortalité et CL₅₀ enregistrés au cours de l'activité cytotoxique de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S.argel*

Dose (µg/ml)	Taux de mortalité (%)					
	Contrôle	K ₂ Cr ₂ O ₇	SAAC	SAME	SAAQ	SAHE
Contrôle	0					
1000		1±0 ^a	1±0 ^a	0,866±0,152 ^a	0,83±0,152 ^a	1±0 ^a
800		1±0 ^{bc}	0,9±0,10 ^{ac}	0,66±0,152 ^a	0,76±0,057 ^{ac}	1±0 ^{bc}
600		1±0 ^b	0,8±0,10 ^{ab}	0,66±0,057 ^a	0,63±0,208 ^a	1±0 ^b
400		1±0 ^b	0,766±0,057 ^{ab}	0,6±0,1 ^a	0,53±0,057 ^a	1±0 ^b
200		1±0 ^b	0,566±0,057 ^a	0,56±0,057 ^a	0,5±0,1 ^a	1±0 ^b
100		0,833±0,152 ^b	0,466±0,057 ^a	0,43±0,057 ^a	0,43±0,057 ^a	0,933±0,047 ^b
10		0,566±0,057 ^{ab}	0,36±0,057 ^a	0,366±0,057 ^a	0,33±0,057 ^a	0,733±0,047 ^b
CL ₅₀ (µg/ml)		8,62	151,83	168,76	199,87	3,43

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=10). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

Les extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle de *S.argel* ainsi que le standard bichromate de potassium ont enregistré des effets cytotoxiques considérables mais différents selon les lots. En effet, l'huile essentielle de *S.argel* a montré un pouvoir cytotoxique très significatif envers les *Artemia salina* et supérieur à celui des extraits acétonique, méthanolique et aqueux (p<0,0001) (**Tableau14 ; Figure 52**). Par ailleurs, l'huile essentielle de *S.argel* a enregistré un effet cytotoxique similaire à celui du produit de référence bichromate de potassium aux différentes doses testées (p =0,54) (**Tableau 14; Figure 52**).

Les extraits méthanolique et aqueux ont présenté, quant à eux, des pouvoirs cytotoxiques équivalents (p =0,93), mais différents de ceux de l'extrait acétonique (p <0,001; p <0,0001) et du bichromate de potassium (p <0,0001) (**Tableau 14 ; Figure 52**).

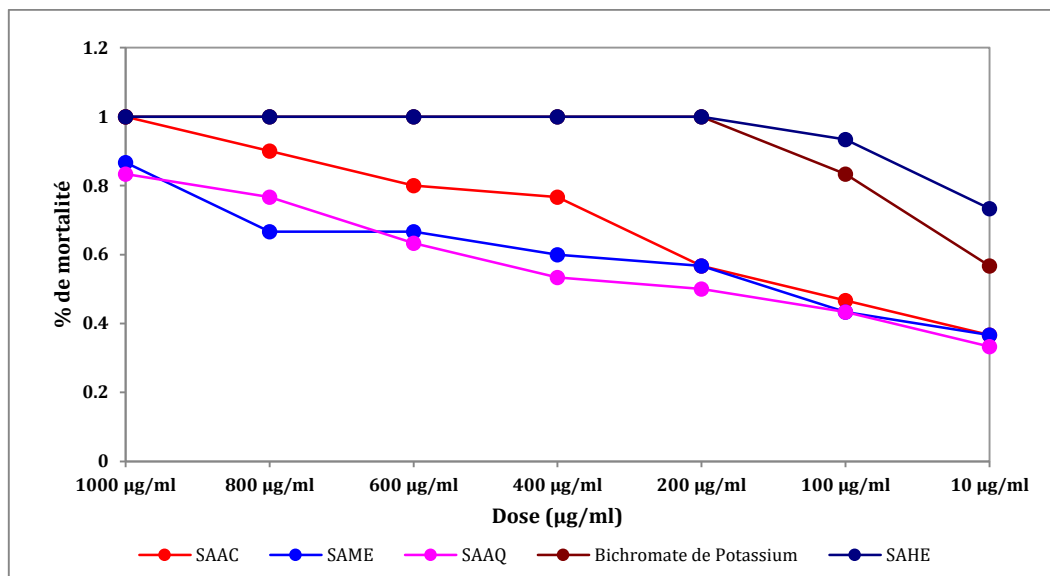


Figure 52 : Taux de mortalité des nauplii *d'Artemia salina* en fonction des doses de l'huile essentielle et des extraits de *S.argel* testées.

Afin de déterminer la CL_{50} de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S.argel* ainsi que celle du standard bichromate de potassium, les logarithmes décimaux des différentes doses testées ont été calculés et les taux de mortalité enregistrés ont été convertis en probit en utilisant la table de Finney (Finney, 1971) (Annexe 2).

Les représentations graphiques des probits en fonction des logarithmes décimaux des doses de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et ceux de *S.argel* ainsi que celle du standard bichromate de potassium ont permis d'obtenir des courbes de régression dont les équations mathématiques sont $y = 1,3664x + 4,2685$, $y = 2,0758e^{0,403x}$, $y = 3,3635e^{0,178x}$, $y = 3,18e^{0,1967x}$ et $y = 1,6491x + 3,4573$ (y = probit ; x = log décimal des doses), respectivement (Figure 53).

Les valeurs des coefficients de détermination obtenues pour SAHE, SAAC, SAME, SAAQ et le standard $K_2Cr_7O_2$ sont $R^2 = 0,85819$, $R^2 = 0,75516$, $R^2 = 0,79292$, $R^2 = 0,85473$ et $R^2 = 0,83271$, respectivement, d'où des coefficients de corrélation $r = +0,83$, $r = +0,68$, $r = +0,74$, $r = +0,83$ et $r = +0,80$, ces derniers sont compris entre -1 et 1 ($-1 < r < 1$), donc la corrélation est dite positive, ces valeurs sont proches de 1 ce qui signifie que la mortalité et les doses sont fortement corrélées (Figure 53).

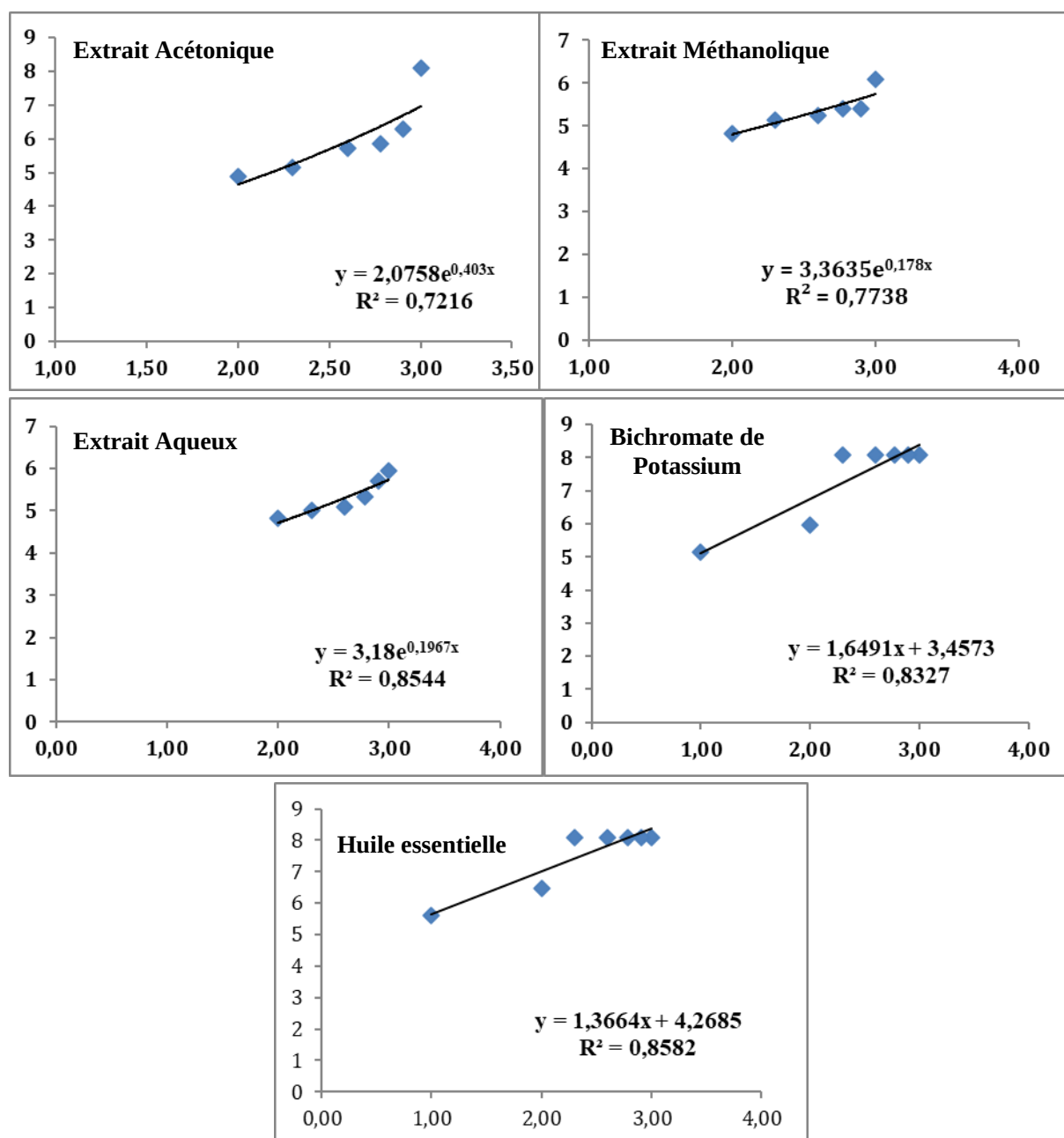


Figure 53 : Courbes de régression des probits en fonction du log décimal des doses testées du bichromate de potassium et des extraits et l'huile essentielle de *S. argel*.

A partir des équations, les concentrations létales 50 (CL₅₀) ont été calculées en remplaçant Y par le probit 50 (5). La CL₅₀ peut être déterminée graphiquement en recherchant l'abscisse du point correspondant au probit 5 sur le graphe (**Cavelier, 1976**). Les CL₅₀ estimées pour l'huile essentielle, les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* et le bichromate de potassium représentent les CL₅₀ théoriques et sont présentées dans le **tableau 14**.

3. Discussion

Le test biologique de létalité des artémias est un test simple qui vise à évaluer la cytotoxicité des composés végétaux bioactifs (Wu, 2014). Le principe de ce test est basé sur la capacité des substances testées à altérer un petit crustacé l'*Artemia salina* (Wu, 2014; Waghulde et al., 2019). Cette méthode est fiable, rapide et largement utilisée pour l'évaluation préliminaire de la cytotoxicité des substances phytochimiques présentes dans les extraits de plantes (Baravalia et al, 2012; Wu, 2014; Ghareeb et al., 2014; Waghulde et al., 2019), par détermination de la concentration létale de 50 % des *Artemia salina* (LC₅₀) (Nerdy et al., 2021).

Une substance est considérée comme cytotoxique lorsqu'elle provoque des troubles chez les organismes vivants entraînant une perversion du comportement ou la mort, ou lorsqu'elle inhibe des processus métaboliques vitaux (Fatope, 1995; Kabubii et al., 2015). Dans cette étude, les extraits et l'huile essentielle de *S.argel* testés ont entraîné la mort des artémias à des concentrations variables. Les variations de concentrations enregistrées au cours de cette expérience pour l'huile essentielle et les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* démontrent que la cytotoxicité de ces derniers est concentration dépendante. En effet, plusieurs études antérieures ont prouvé que la cytotoxicité des extraits des plantes médicinales est concentration dépendante (Kosasih et al., 2019; Talukder et al., 2020; Nerdy et al., 2021).

Le test biologique de létalité des artémias stipule qu'une valeur de CL₅₀ inférieure à 1000 µg/ml est considérée comme bioactive dans l'évaluation de la toxicité des extraits de plantes (Kabubii et al., 2015; Umaru et al., 2018; Nerdy et al., 2021). Dans la présente étude, tous les extraits de *S. argel* ainsi que son huile essentielle ont exprimé des valeurs de CL₅₀ inférieures à 1000 µg/ml. Néanmoins, l'huile essentielle de *S. argel* a présenté une valeur de CL₅₀ largement inférieure à celles des extraits acétonique, méthanolique et aqueux. Cette variation du potentiel cytotoxique pourrait s'expliquer, entre autre, par leur composition phytochimique différente en métabolites secondaires (Ghareeb et al., 2014; Nerdy et al., 2021).

Les extraits de plantes au pouvoir cytotoxique sont des candidats potentiels au développement de substances anticancéreuses (Baravalia et al, 2012; Nerdy et al., 2021). Dans cette optique, le test de cytotoxicité des Artémias a été considéré comme le test biologique principal de dépistage de l'activité anticancéreuse (Ghareeb et al., 2014), dans la mesure où il fournit des

données préliminaires importantes pour aider à sélectionner des extraits de plantes présentant des propriétés antinéoplasiques potentielles pour des travaux futurs (**Hussain et al., 2007**). Malheureusement, les niveaux de cytotoxicité de plusieurs plantes médicinales ne sont pas encore connus (**Nerdy et al., 2021**). Dans la présente étude, l'évaluation préliminaire de la cytotoxicité de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* par le test de létalité des artémias, a montré que ces derniers sont des candidats potentiels au développement futur d'agents anticancéreux provenant de sources naturelles.

Le pouvoir cytotoxique enregistré au cours de cette étude pour les extraits de *S. argel* pourrait être le résultat d'une action synergique ou additive entre les composants de chacun de ces extraits.

Les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* sont majoritairement composés de flavonoïdes (**Référence : étude phytochimique, page 82**), ces derniers pourraient être responsables en grande partie de l'effet cytotoxique enregistré sur les *Artemia salina*. En effet, les flavonoïdes peuvent contribuer à l'effet cytotoxique de ces extraits en induisant une irritation du système digestif et en inhibant les récepteurs gustatifs des *Artemia salina*, provoquant ainsi un arrêt de la prise alimentaire et une augmentation de la sensation de faim, conduisant ainsi à la mort de ces larves (**Mubarak et al., 2019; Nerdy et al., 2021**). Parmi les flavonoïdes présents dans les trois extraits testés, la rutine est le composant majoritaire en commun entre ces derniers. Plusieurs études ont mis en évidence le pouvoir cytotoxique de la rutine. En effet, l'étude réalisée par **Canturk et al., (2016)** a mis en évidence le pouvoir cytotoxique de la rutine *in vivo* par le test de létalité des crevettes de saumure *Artemia salina* et *in vitro* sur la lignée cellulaire humaine ARH-77 (myélome multiple) (**Canturk et al., 2016**). Une autre étude antérieure a révélé l'action cytotoxique de la rutine sur les cellules 786-O du carcinome rénal où une diminution significative de la viabilité cellulaire a été observée (**Caparica et al., 2020**).

Un autre flavonoïde commun aux trois extraits testés est le kaempferol, dont le potentiel cytotoxique a été prouvé grâce à la modulation des voies de signalisation cellulaire en plus de l'induction de l'apoptose et de l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses. Cela conduit à l'activation des gènes suppresseurs de tumeurs, à l'inhibition de l'angiogenèse, des voies PI3K/AKT, STAT3, du facteur de transcription AP-1, Nrf-2 et d'autres molécules de signalisation cellulaire (**Afroze et al., 2022**). Les dérivés glucosides du kaempferol, à savoir, le kaempferol-3-O-rutinoside et le kaempferol-3-O-diglucoside-7-O-glucoside, présents

majoritairement dans les trois extraits testés, pourraient indirectement participer à l'effet cytotoxique observé via leur hydrolyse en kaempferol par la β -glucosidase (**Wang et al., 2018**).

Par ailleurs, l'huile essentielle de *S. argel* est principalement composée de monoterpènes. Ces derniers sont connus pour leurs propriétés chimiopréventives et chimiothérapeutiques contre le cancer (**Nerdy et al., 2021**). En effet, plusieurs composés bioactifs monoterpéniques ont été isolés et se sont révélés actifs contre des lignées cellulaires cancéreuses spécifiques (**Prakash, 2018**). Dans la présente étude, l'huile essentielle de *S. argel* a exprimé un effet cytotoxique remarquable qui pourrait être la conséquence de l'action synergique et/ou additive de plusieurs de ses composants monoterpéniques, parmi lesquels figurent le linalol, le géraniol et l' α -terpineol. Le linalol est le composant majoritaire de l'huile essentielle de *S. argel*, il pourrait ainsi être responsable en grande partie de l'effet cytotoxique enregistré. En effet, plusieurs études antérieures ont mis en évidence l'effet cytotoxique du linalol, notamment l'étude réalisée par **Chang et Shen (2014)**, dans laquelle l'effet cytotoxique du linalol sur les cellules cancéreuses du sein, colorectales et hépatiques a été démontré par l'utilisation de l'analyse WST-1 ainsi que l'activation par ce dernier d'une réponse immunitaire cellulaire Th1 dans les cellules T-47D (**Chang and Shen, 2014**). Une autre étude a permis de mettre en évidence le pouvoir cytotoxique du linalol isolé à partir de la lavande *Lavandula angustifolia* sur des cellules endothéliales et fibroblastiques de type HMEC-1, HNDF et 153BR (**Prashar et al., 2004**).

Le géraniol est un autre monoterpène présent en quantité considérable dans l'huile essentielle de *S. argel* qui pourrait participer à l'effet cytotoxique enregistré. Effectivement, une étude récente a pu démontrer le pouvoir cytotoxique du géraniol sur les cellules MCF-7 à l'aide des tests MTT et d'absorption du rouge neutre (NRU) (**Mamur, 2021**).

Un autre composant potentiel de l'huile essentielle de *S. argel* qui pourrait contribuer à son pouvoir cytotoxique est l' α -terpinéol. En effet, la cytotoxicité de l' α -terpinéol envers différentes lignées de cellules tumorales a été évaluée *in vitro*. Les résultats obtenus suggèrent que l' α -terpinéol inhibe la croissance des cellules tumorales par un mécanisme impliquant l'inhibition de la voie NF- κ B (**Bashir Hassan et al., 2010**). Une autre étude plus récente a mis en évidence l'effet anti-tumoral de l' α -terpinéol sur la lignée cellulaire du sarcome murin 180 par des mécanismes cytogénétiques et/ou une perte de l'intégrité de la membrane cellulaire (**Negreiros et al., 2021**).

4. Conclusion

L'évaluation de l'activité cytotoxique de l'huile essentielle et des extraits de *S. argel* à l'aide du test de létalité sur les *Artemia salina* a permis de fournir des données préliminaires intéressantes montrant que ces derniers pourraient constituer des candidats potentiels au développement futur d'agents anticancéreux.

Etudes *In vitro*

Activité Antioxydante

Activité antioxydante

1. Méthode

L'activité anti-oxydante a été évaluée en utilisant le radical stable DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Le dosage a été réalisé selon la technique standard décrite par Blois (**Blois, 1958**). Le principe du test repose sur la mise en évidence du pouvoir anti-radicalaire d'une substance ou d'un extrait en mesurant la capacité de ces derniers à réduire le radical chimique DPPH par transfert d'un hydrogène. Le DPPH, initialement de couleur violet, se transforme en DPPH-H de couleur jaune (**Figure 54**).

Des dilutions du témoin positif hydroxytoluène butylé (BHT) ainsi que des extraits à tester ont été préparées, puis, 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH (0,2 mM) a été ajouté à 1 ml d'un échantillon donné à une concentration donnée. Les échantillons ont été incubés pendant 30 min à l'abri de la lumière à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 517 nm.

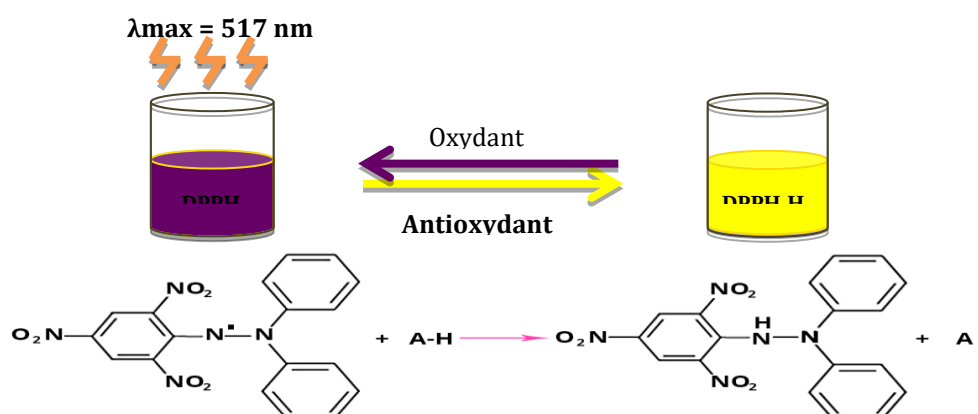


Figure 54 : Principe du test de l'activité anti-oxydante par le radical DPPH

Après la mesure de leurs absorbances, les valeurs obtenues ont permis de calculer des pourcentages du pouvoir antioxydant, puis de tracer des courbes à partir desquelles les valeurs d'IC50 ont été déterminées. L'activité antioxydante a été calculée selon la formule suivante :

$$AA\% = 100 (A_0 - A_t) / A_0$$

AA% = Activité antioxydante

A_0 = Absorbance à $t=0$ min (DPPH seul)

A_t = Absorbance à $t=30$ minutes (après incubation (DPPH+extrait)).

La concentration inhibitrice IC50 peut être calculée à partir de l'équation de la pente de la droite (% d'inhibition en fonction de la concentration) par le remplacement de y par 50 (50%) et le calcul de x, qui correspond à la concentration d'inhibition à 50% ; peut être déduit graphiquement par interpolation du point % AA=50.

2. Résultats

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) de *S.argel* sont présentés sous forme de moyenne $\pm$ l'écart type dans le **Tableau 15**. L'activité anti-radicalaire des extraits SAAC, SAME et SAAQ des feuilles de *S. argel* a été évaluée en déterminant les valeurs des concentrations inhibitrices à 50% d'activité (IC50). Les résultats obtenus montrent que les extraits SAAC, SAME et SAAQ expriment un important pouvoir de piégeage radicalaire avec des valeurs IC50 de 36,05, 30 et 17,33 μ g/ml, respectivement (**Tableau 15**). Cependant, le standard BHT présente une activité anti-radicalaire supérieure à celle des extraits testés avec une valeur IC50 de 9,43 $\pm$ 0,412 μ g/ml ($p < 0,0001$).

Tableau 15 : Activité anti-oxydante des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux lyophilisé (SAAQ) de *S.argel*

Concentrations (mg/ml)	Activité anti-oxydante (%)			
	BTH	SAAC	SAME	SAAQ
0,012 (12 μ g)	66,8 $\pm$ 0,55 ^a	39,89 $\pm$ 0,23 ^c	41,48 $\pm$ 0,01 ^c	51,99 $\pm$ 0,01 ^b
0,03 (30 μ g)	80,7 $\pm$ 0,34 ^a	47,78 $\pm$ 0,5 ^b	50,01 $\pm$ 0,03 ^b	55,83 $\pm$ 0,06 ^b
0,06 (60 μ g)	91,2 $\pm$ 0,7 ^a	55,52 $\pm$ 0,43 ^b	59,6 $\pm$ 0,05 ^b	60,41 $\pm$ 0,02 ^b
0,12 (120 μ g)	92,8 $\pm$ 0,53 ^a	63,17 $\pm$ 0,62 ^c	67,73 $\pm$ 0,09 ^b	68,60 $\pm$ 0,03 ^b
0,3 (300 μ g)	94 $\pm$ 0,14 ^a	79,94 $\pm$ 0,4 ^b	82,4 $\pm$ 0,09 ^b	85,36 $\pm$ 0,02 ^b
0,6 (600 μ g)	96,1 $\pm$ 0,56 ^a	84,35 $\pm$ 0,14 ^c	88,7 $\pm$ 0,003 ^b	91,15 $\pm$ 0,1 ^b
0,8 (800 μ g)	97,5 $\pm$ 0,31 ^a	90,17 $\pm$ 0,25 ^c	92,4 $\pm$ 0,09 ^c	95,09 $\pm$ 0,02 ^b
IC50 (μ g/mL)	9,43 $\pm$ 0,34 ^a	36,05 $\pm$ 2,76 ^c	30 $\pm$ 0,15 ^c	17,33 $\pm$ 0,04 ^b

Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

3. Discussion

L'activité de piégeage du radical DPPH est considérée comme un test fiable pour évaluer le potentiel antioxydant d'un composé car il est extrêmement sensible et précis (**Koleva et al., 2002**). L'effet des extraits SAAC, SAME et SAAQ sur le radical DPPH suggère la présence de composants ayant la capacité d'interagir avec les radicaux libres en agissant comme un donneur d'électrons ou des atomes d'hydrogène. Les flavonoïdes et les acides phénoliques sont des substances antioxydantes capables de piéger les radicaux superoxydes libres (**Ghasemzadeh et al., 2011**). La richesse des extraits SAAC, SAME et SAAQ en flavonoïdes comme la rutine, le Kaempferol-3-O-rutinoside, le Kaempferol-3-O-diglucoside-7-O-glucoside, l'Astragaline et le Kaempferol, pourrait expliquer le pouvoir antioxydant enregistré. En effet, la quercétine et la rutine, qui sont de puissants antioxydants, peuvent librement donner des électrons ou de l'hydrogène pour neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Sikder et al., 2014**). En effet, la forte capacité antioxydante de la rutine a été démontrée par de nombreuses études (**Nagasawa et al., 2002; Chua, 2013; Sikder et al., 2014**). La puissante activité antioxydante de la rutine est principalement due à la présence de cycles phénoliques et de groupes hydroxyles libres dans sa structure chimique. Ces groupes hydroxyles libres pourraient donner de l'hydrogène pour empêcher une oxydation supplémentaire (**Chua, 2013**). De même, il a été rapporté que le kaempférol a une excellente activité antioxydante et qu'il réagirait avec H_2O_2 , le superoxyde et le radical peroxyde *in vitro* (**Erben-Russ et al., 1987 ; Tsai et al., 2018**). Une autre étude de Wang et collaborateurs suggère que le Kaempferol-3-O-rutinoside et le Kaempferol-3-O-glucoside ont une activité antioxydante considérable médiée par la réduction du stress oxydatif (**Wang et al., 2014 (a)**). De plus, la présence de dérivés saponine dans les extraits SAAC, SAME et SAAQ des feuilles de *S. argel* pourrait également contribuer à l'effet antioxydant observé. En effet, les saponines sont également douées d'une activité anti-oxydante ou réductrice (**Francis et al., 2002**), elles agiraient en récupérant les superoxydes en formant des intermédiaires hydroperoxydes, empêchant ainsi les dommages biomoléculaires par les radicaux libres (**Yoshiki et Okubo, 1995; Francis et al., 2002**).

4. Conclusion

La présente étude a permis de mettre en évidence le pouvoir antioxydant des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel*.

Activité Antibactérienne

Activité antibactérienne

1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes testées ont été fournies par l'Institut de Santé Belge SCIENSANO (Belgique) (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Souches bactériennes testées

Souches Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615
Souches Gram -	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Salmonella enterica</i> sérotype <i>choleraesuis</i> ATCC 14028

2. Matériel

Le matériel, les milieux de culture et les réactifs utilisés pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits et de l'huile essentielle de *S. argel* sont représentés dans le **Tableau 17**.

Tableau 17 : Liste du matériel, des milieux et des réactifs utilisés

Matériel et Appareillage	Réactifs et Milieux
Micropipette Embouts Incubateur Boîte de pétri Disques stériles 6mm de diamètre Ecouillons stériles Anse de platine Pince stérile Microplaque	Eau physiologique stérile Disques antibiotiques 0,5 Mac Farland standard de turbidité Milieu Müller Hinton Agar DMSO INT (<i>p</i> -iodonitrotetrazolium) Muller Hinton Broth Standard gentamicine Standard Linalol

3. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque

Le test a été réalisé selon la méthode standard de diffusion sur gélose pour tester la sensibilité des bactéries aux extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que l'huile essentielle de *S. argel* (CLSI, 2006). Cette méthode a été utilisée comme test préliminaire, dans la mesure où elle permet d'obtenir des résultats principalement qualitatifs.

3.1. Méthode

Une suspension bactérienne a été préparée de façon à obtenir une turbidité équivalente à celle du standard 0,5 Mac Farland (**Watts et al., 2007**). Une fois la suspension de l'inoculum préparée, un écouvillon stérile a été trempé dans la suspension puis les boîtes de pétri préalablement coulées avec de la gélose Muller Hinton, ont été ensemencées en stries uniformes sur toute la surface de la gélose, trois fois de suite en faisant tourner la boîte de 60° à chaque fois, afin d'assurer une distribution homogène de l'inoculum. Enfin, un écouvillonnage du bord de la gélose a été effectué.

Par la suite, des disques stériles imprégnés de la substance à tester ont été placés sur la surface de la plaque de gélose inoculée. La disposition des disques sur le tapis bactérien a suivi le schéma ci-dessous (**Figure 55**). Quatre disques stériles de 6 mm de diamètre ont été déposés dans l'ordre suivant pour le test de l'huile essentielle de *S. argel* : un disque imbibé avec 15 µl d'huile essentielle pure, un second avec 15 µl de linalol à 57%, un troisième disque servant de témoin négatif avec 15 µl de DMSO et un disque de gentamicine à 30 µg comme témoin positif.

Par ailleurs, pour tester l'efficacité antibactérienne des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel*, trois disques de 6 mm de diamètre ont été utilisés par extrait, un disque imbibé de 15 µl d'extrait à 100 mg/ml, un deuxième disque servant de témoin négatif avec 15 µl de DMSO et un troisième disque de gentamicine à 30 µg comme témoin positif.

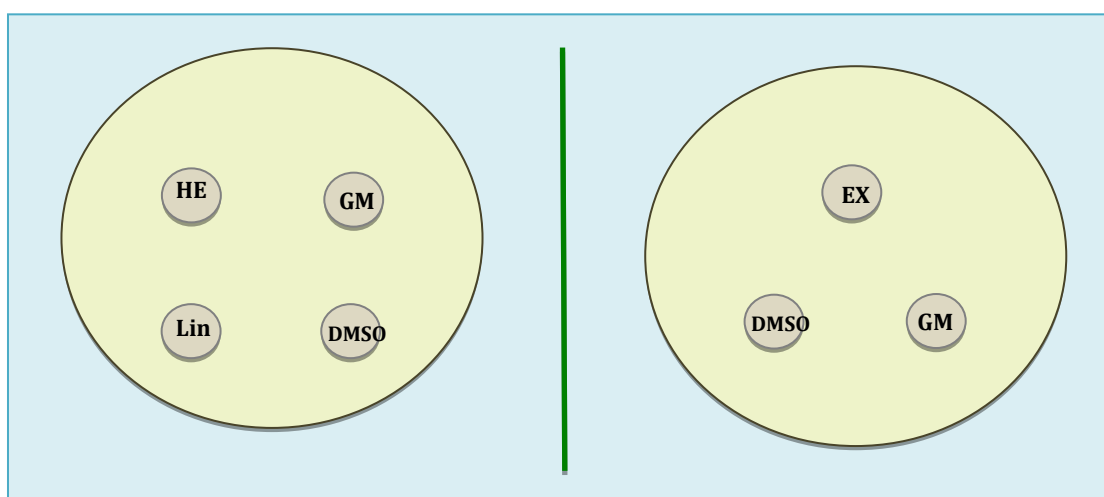


Figure 55 : Schéma de la disposition des disques lors du test de diffusion sur gélose des extraits et huile essentielle de *S. argel*. **HE**: Huile essentielle, **Lin**: Linalol, **EX**: Extrait, **GM**: Gentamicine, **DMSO**: Diméthylsulfoxyde.

La technique a été réalisée en triplicata au cours de trois tests successifs. Les boîtes ont été inversées et placées dans un incubateur réglé à 35 ° C (± 2 ° C) dans les 15 min suivant l'application des disques. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'un pied à coulisse le diamètre de la zone d'inhibition après 18 à 24 h d'incubation.

3.2. Résultats

L'activité antibactérienne des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que de l'huile essentielle de *S. argel* a été évaluée par la méthode de diffusion sur gélose en mesurant la zone d'inhibition contre des bactéries d'importance médicale.

Les résultats obtenus ont montré une activité antibactérienne significative de l'huile essentielle contre les bactéries Gram positif et Gram négatif testées (**Tableau 18, Figure 56**) contrairement aux extraits acétonique, méthanolique et aqueux pour lesquels aucun effet antibactérien n'a été enregistré à la concentration de 100 mg/ml.

Tableau 18 : Diamètres d'inhibition (mm) de la gentamicine, le linalol et l'huile essentielle de *S. argel* contre les bactéries testées

	Diamètres d'inhibition (mm)		
	SAHE	Linalol 57%	Gentamicine
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	32,97 $\pm$ 1,72 ^a	23,15 $\pm$ 0,57 ^b	31,41 $\pm$ 1,08 ^a
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	41,00 $\pm$ 2,11 ^a	31,87 $\pm$ 1,67 ^b	33,18 $\pm$ 1,62 ^b
<i>Salmonella choleraesuis</i> ATCC 14028	16,79 $\pm$ 1,00 ^a	11,10 $\pm$ 0,61 ^b	24,56 $\pm$ 0,73 ^c
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	39,84 $\pm$ 2,25 ^a	23,88 $\pm$ 0,52 ^b	34,02 $\pm$ 3,05 ^c
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	30,1 $\pm$ 0,18 ^{ab}	22,27 $\pm$ 1,36 ^b	32,60 $\pm$ 1,36 ^a
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	30,71 $\pm$ 0,83 ^a	26,76 $\pm$ 1,42 ^b	30,94 $\pm$ 0,91 ^{ab}

Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type. Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

L'huile essentielle de *S. argel* a présenté une activité antimicrobienne contre les bactéries *E. coli* ATCC 25922 ($P < 0,001$) et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ($P < 0,028$) supérieure à celle du standard gentamicine et un effet comparable à ce dernier contre les bactéries *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 6538 et *S. pyogenes* ATCC 19615 (**Tableau 18**). Par ailleurs, l'huile essentielle a montré un effet antibactérien supérieur à celui du linalol à 57% contre l'ensemble des bactéries testées ($P < 0,0001$) (**Tableau 18, Figure 56**).

Parmi les bactéries à Gram négatif, *E. coli* ATCC 25922, et *E. coli* ATCC 35218 ont enregistré les zones d'inhibition les plus élevées avec des diamètres de 41 mm et 32,97 mm, respectivement, tandis que celle de *Salmonella choleraesuis* ATCC 14028 est de 16,79 mm. Par ailleurs, la bactérie à Gram positif *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a enregistré la plus importante zone d'inhibition avec un diamètre de 39,84 mm, alors que les bactéries *S. aureus* ATCC 6538 et *S. pyogenes* ATCC 19615 ont présenté des zones d'inhibition similaires (**Tableau 18, Figure 56**).

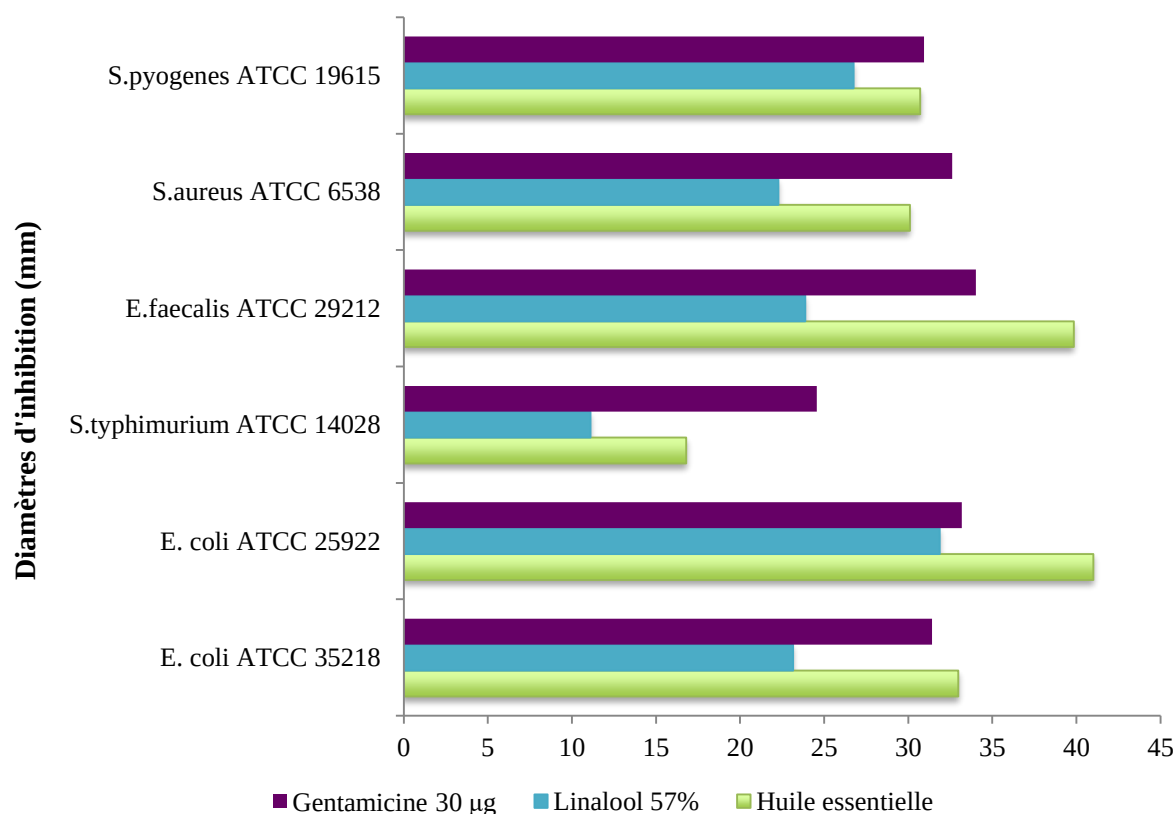


Figure 56 : Diamètres d'inhibition de la gentamicine, le linalol et l'huile essentielle de *S. argel* contre les bactéries testées

Le linalol composant majoritaire de l'huile essentielle de *S. argel* représente 57% de sa composition totale. Afin de mettre en évidence la relation entre l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *S. argel* et l'action de son composant majoritaire le linalol, un test de régression a été réalisé après avoir prouvé par le test de Shapiro-Wilk que les variables testées suivaient la loi normale.

La représentation graphique des diamètres d'inhibition de l'huile essentielle de *S. argel* en fonction de ceux du linalol à 57% a permis d'obtenir une régression linéaire très significative ($P < 0,0001$) dont l'équation mathématique est la suivante : $SAHE = 1,106 \text{ Lin}57\% + 6,284$ (Figure 57).

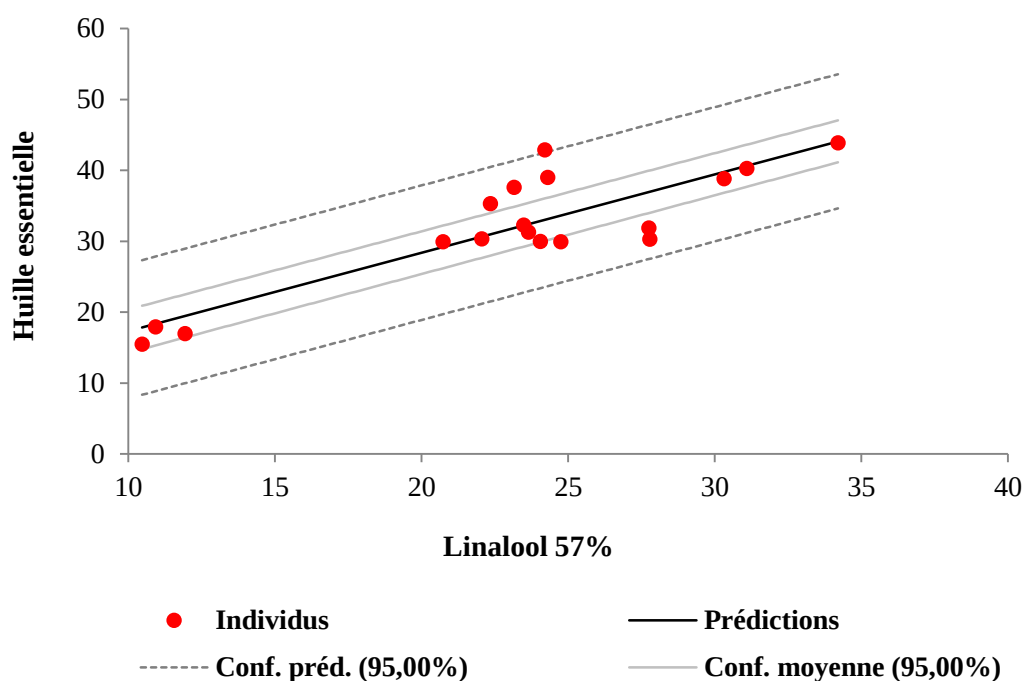


Figure 57 : Droite de régression des diamètres d'inhibition de l'huile essentielle de *S. argel* en fonction du linalol à 57%

Les résultats obtenus montrent que les deux variables suivent la même tendance avec un coefficient de corrélation $r = +0,87$, ce dernier est compris entre -1 et 1 ($-1 < r < 1$), de ce fait la corrélation est dite positive. Cette valeur est proche de 1 ce qui signifie que les effets antibactériens de l'huile essentielle et du linalol à 57% sont fortement corrélés.

Par ailleurs, la valeur du coefficient de détermination obtenue est $R^2 = 0,754$, ce qui signifie que l'effet antibactérien de l'huile essentielle de *S. argel* est dû à 75% à l'action du linalol.

4. Détermination des CMI et des CMB

4.1. Détermination de la CMI par la technique de microdilution sur microplaque

4.1.1. Méthode

Le test a été réalisé selon la méthode de microdilution sur microplaque pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CLSI, 2012). Afin de déterminer la valeur de la CMI, une suspension bactérienne a été préparée de façon à obtenir une turbidité équivalente à celle du standard 0,5 Mac Farland (Watts *et al.*, 2007) .. Trois solutions mères ont été préparées : une solution d'huile essentielle à 20%, une solution de linalol à 20% et une solution de gentamicine à 40 mg/l pour l'ensemble des bactéries testées mise à part pour les bactéries *Escherichia coli* ATCC 35218 et *Escherichia coli* ATCC 25922 pour lesquelles des solutions à 10% d'huile essentielle et de linalol ont été testées.

Par la suite, une microplaque de 96 puits a été utilisée. Cent (100) µl de MHB sont déposés dans les 12 puits de la microplaque. Dans le puit N°1, 100 µl de substance à tester ont été ajoutés. Les puits N°11 et N°12 servent au contrôle de la croissance et de la stérilité du milieu. Par la suite, 100 µl du mélange MHB/substance à tester sont prélevés du premier puit et déposés dans le puit N°2 en les passant du deuxième puit au troisième, puis du troisième au quatrième et ainsi de suite jusqu'au puits N°10 de façon à obtenir une gamme de dilutions successives de demi en demi. Les cent (100) µl restants en fin de dilution ont été éliminés. Enfin, 100 µl de l'inoculum préalablement préparé sont ajoutés à l'ensemble des puits, mis à part le puits N°12. Une fois que la procédure a été réalisée, la microplaque a été scellée et placée dans une étuve à 35°C pendant 24h.

Après une durée d'incubation de 24 heures, une solution de p-iodonitrotétrazolium a été préparée à raison de 0,2 mg/ml dans de l'eau distillée. La lecture des résultats a été effectuée après l'ajout de 40 µL d'iodonitrotétrazolium (INT) dans chaque puits. Par la suite, la microplaque a été incubée à 35°C pendant 30 à 120 min.

La présence de bactéries vivantes a été détectée par la coloration en rose de l'INT. Chaque test a été réalisé trois fois au cours de trois expériences successives.

4.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide

4.2.1. Méthode

A partir de la microplaque utilisée pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice, la dilution située après la CMI, la CMI ainsi que les deux dilutions avant la CMI ont été ensemencées sur une gélose divisée en quatre quartiers, un quartier pour chaque

dilution (CLSI, 2012). Pour ce faire, 20 µL de chaque puits sont prélevés et déposés au bord extérieur d'un des quartiers puis ensemencés en stries à l'aide d'une anse de platine.

La technique a été réalisée en triplicata au cours de trois tests successifs. Les boîtes ont été placées dans un incubateur réglé à 37 ° C pendant 24h.

4.3. Résultats

Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de *S. argel* a présenté une activité antibactérienne significative sur toutes les bactéries testées. Les valeurs de CMI enregistrées variaient entre 1,066 à 4,269 mg/ml pour les bactéries Gram négatif et de 1,279 à 8,541 mg/ml pour les bactéries Gram positif (Tableau 19, Figure 58).

Tableau 19 : Valeurs des CMI et CMB de l'huile essentielle de *S. argel* et du linalol

	Gentamicine (mg/l)	EOA (mg/ml)			Linalol 57% (mg/ml)		
	MIC	MIC	MBC	MBC/MIC	MIC	MBC	MBC/MBI
<i>E. coli</i> ATCC 35218	0.104	1.066	20	18.76	10.725	160	14.92
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.156	1.279	20	15.64	2.676	40	14.96
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 14028	1.666	4.269	50	11.71	14.3	100	6.99
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	5	8.541	100	11.71	10.725	100	9.32
<i>S. aureus</i> ATCC 653	0.078	1.279	20	15.64	2.676	40	14.95
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	0.156	1.279	20	15.64	2.676	40	14.95

Par ailleurs, le linalol a présenté des valeurs de CMI supérieures à celle de SAHE pour toutes les bactéries testées (Tableau 19, Figure 58). Ces résultats corroborent ceux obtenus par la méthode de diffusion sur gélose.

Le standard Gentamicine a enregistré des valeurs de CMI supérieures à celles de SAHE, allant de 0,078 à 5 mg/L (**Tableau 19, Figure 58**). La disparité entre les activités de l'huile essentielle et du médicament antimicrobien standard peut être attribuée aux mélanges de composés bioactifs présents dans l'huile par rapport au composé pur contenu dans les antibiotiques standards (**Gatsing et al, 2012**).

Les valeurs de CMB de l'huile essentielle de *S. argel* et celle de son composant majoritaire le linalol sont représentées dans le **Tableau 19**.

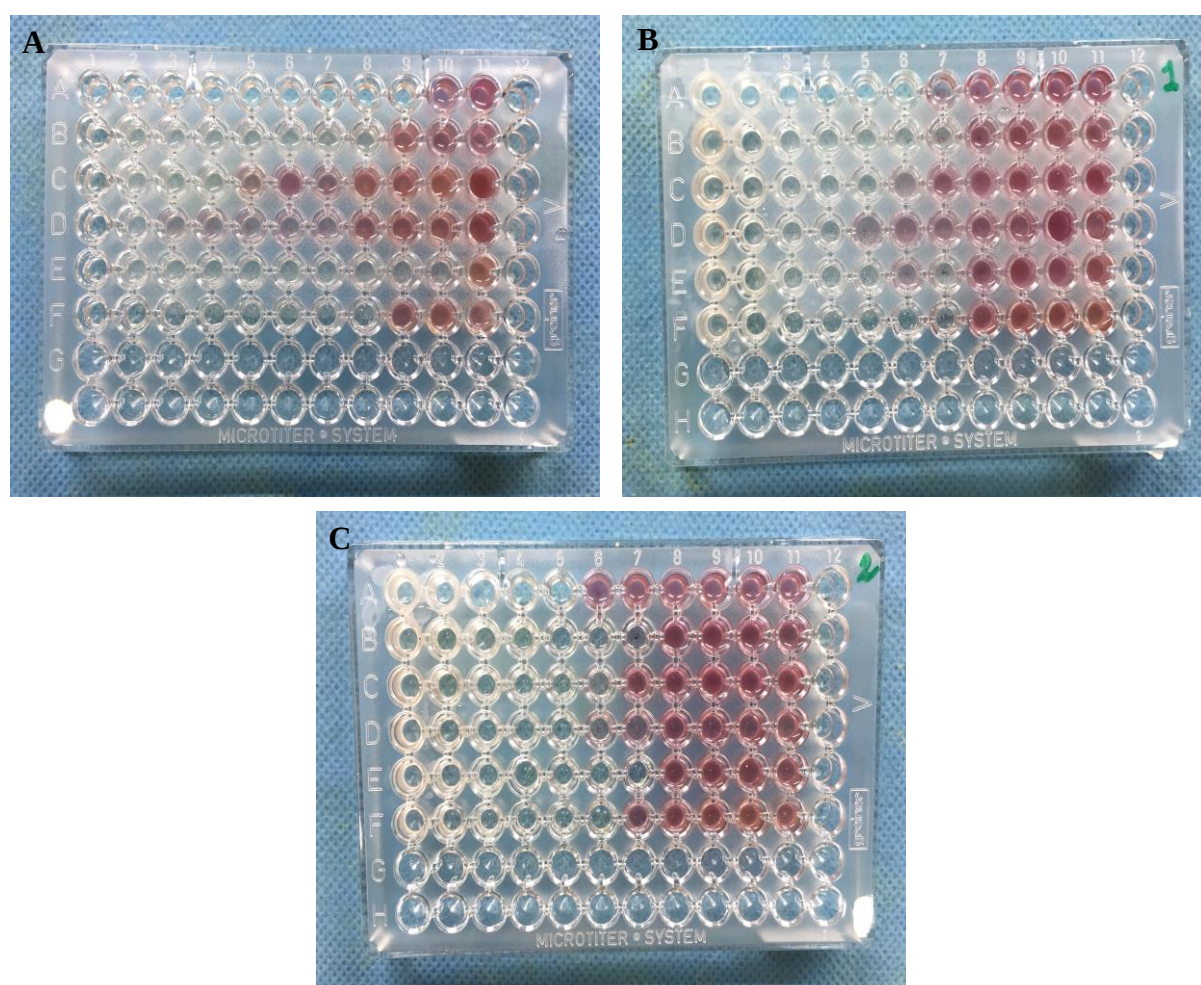


Figure 58 : Détermination des CMI par microdilution sur microplaques
A: Gentamicine ; **B:** Huile essentielle *S. argel* ; **C:** Linalol.

Ligne A: *E. coli* ATCC 35218, **ligne B:** *E. coli* ATCC 25922, **ligne C:** *S. enterica choleraesuis* ATCC 14028, **ligne D:** *E. faecalis* ATCC 29212, **ligne E:** *S. aureus* ATCC 6538, **ligne F:** *S. pyogenes* ATCC 19615. Les lignes G et H sont vides. **Colonne 11:** contrôle négatif, **colonne 12:** contrôle de stérilité.

5. Discussion

Au cours de ces dernières années, l'augmentation de l'incidence de la résistance multiple chez les micro-organismes pathogènes humains et animaux a été largement constatée, en grande partie en raison de l'utilisation irréfléchie de médicaments antimicrobiens commerciaux couramment utilisés dans le traitement des maladies infectieuses animales et humaines (**Zewdu et Cornelius, 2009**). De ce fait, la mise en évidence de nouvelles substances antimicrobiennes provenant de diverses sources telles que les plantes médicinales devient nécessaire. Les huiles essentielles et les extraits de plantes sont d'excellents candidats potentiels.

Certaines recherches ont révélé que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles peut être supérieure, inférieure ou étroitement liée à l'action de leurs composants principaux (**Herman et al., 2015**). De plus, il a été rapporté que le mécanisme antibactérien des substances actives peut être un mécanisme global plutôt qu'unique (**Diao et al., 2014**) induit par différentes interactions entre les composés des huiles essentielles (**Herman et al., 2015**).

Habituellement, les huiles essentielles ont une activité antimicrobienne supérieure à celle de leurs principaux composants, ce qui suggère des interactions possibles entre tous leurs constituants (**Herman et al., 2015**). Dans la présente étude, l'huile essentielle de *S. argel* a enregistré un effet antibactérien, contre les bactéries testées, supérieur à celui de son composant majoritaire le linalol. Les résultats obtenus ont montré que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *S. argel* est attribuée à 75% à l'action du linalol, les 25% restant pourraient être le résultat de l'action synergique ou additive d'autres composants, à savoir, le géraniol, l' α -terpinéol, le terpinène-4-ol et le limonène.

En effet, le linalol présente une activité antimicrobienne contre différents micro-organismes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*). Son activité antibactérienne a été attribuée à une déstabilisation fonctionnelle de la membrane bactérienne et à une augmentation de la sensibilité des souches bactériennes aux agents antimicrobiens classiques (**Aprotosoie et al., 2014**). Les études de différents scientifiques ont montré que le traitement au linalol présentait une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* (**Mughal, 2019**). Par ailleurs, l'étude réalisée par **Liu et al., (2020)** a permis de mettre en évidence le mécanisme d'action du linalol. Ce dernier entraînerait une destruction de l'intégrité de la membrane, une augmentation de la perméabilité membranaire et une fuite des acides nucléiques ; en plus

d'une dépolarisation de la membrane cellulaire, une activité irrégulière du métabolisme cellulaire et l'endommagement de la chaîne respiratoire. Ces changements conduisent finalement à la mort cellulaire (**Liu et al., 2020**).

Le géraniol ; autre composant de l'huile essentielle de *S. argel* pourrait également participer à son activité antibactérienne grâce à son caractère hydrophobe.

En effet, le mécanisme d'action possible de l'activité antimicrobienne du géraniol (caractère lipophile) s'explique par sa capacité à adhérer aux lipides membranaires du microorganisme, interagissant avec ses composants, le rendant plus perméable, et se liant aux sites intracellulaires essentiels, pour détruire leur structures (**Lira et al., 2020**), entraînant ainsi une perte d'ions, une réduction du potentiel électrique des membranes, une perte de fonction des protons et une diminution de l'ATP. Ces changements favorisent la mort cellulaire des bactéries (**Zanetti et al., 2015**).

Par ailleurs, l' α -terpinéol et le terpinène-4-ol présents dans la composition de l'huile essentielle de *S. argel* ont une activité antibactérienne caractéristique qui pourrait contribuer à l'effet antibactérien enregistré. Effectivement, le mécanisme bactériostatique de ces deux terpinéols isomères pourrait être attribué à la destruction de l'intégrité de la membrane cellulaire et de la structure de la paroi cellulaire ; modifiant ainsi sa perméabilité ; il en résulte la fuite de substances intracellulaires telles que l'AKP, l'acide nucléique et les protéines; et la dépolarisation de la membrane cellulaire. Ces changements entraînent la décomposition et la mort des cellules (**Huang et al., 2020**).

Enfin, le limonène présent dans l'huile essentielle de *S. argel* pourrait également contribuer à l'effet antibactérien observé dans la mesure où il a démontré des effets antibiotiques importants contre *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* (**Russo et Marcu, 2017**).

La présente étude confirme à la fois l'effet bactériostatique et bactéricide de l'huile essentielle de *S. argel* et du linalol, aussi bien sur les bactéries Gram-positives que Gram-négatives testées. Le mécanisme d'action de l'huile essentielle de *S. argel* doit être étudié à l'avenir.

D'après **Swenson et al., (2007)**, une CMB favorable serait généralement équivalente ou supérieure de 1 ou 2 dilutions à la CMI des substances normalement considérées comme bactéricides (**Swenson et al., 2007**). Par conséquent, dans les conditions expérimentales de cette étude, l'huile essentielle de *S. argel* et le linalol peuvent être considérés comme bactériostatiques à faibles concentrations, et bactéricides à des concentrations plus élevées.

6. Conclusion

La présente étude a permis la mise en évidence du pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de *S. argel* sur six bactéries d'intérêt médical et la détermination de ses CMI et CMB. L'étude a également déterminé le taux de participation de son composant majoritaire le linalol dans l'effet antibactérien enregistré.

Etudes *In vivo*

Activité Anti-inflammatoire

Activité anti-inflammatoire

L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) ainsi que de l'huile essentielle (SAHE) de *S. argel* a été réalisée selon trois modèles expérimentaux.

1. Œdème de la patte induit par la carragénine

1.1. Méthode

Le test d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire selon le modèle de l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat a été réalisé selon la méthode décrite par Winter *et al.* (Winter *et al.*, 1962).

Dix groupes de 6 rats chacun ont été traités respectivement avec SAAC (250 et 400 mg/kg), SAME (250 et 400 mg/kg), SAAQ (250 et 400 mg/kg), SAHE (250 et 400 mg/kg), l'indométacine (10 mg/kg) et l'eau distillée (10 ml/kg). Une heure après administration des traitements, un œdème aigu a été induit par l'injection de 0,1 ml d'une solution de carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de la patte arrière gauche des rats. La patte arrière droite a servi de patte de référence pour la comparaison. La mesure du diamètre de la patte a été réalisée à l'aide d'un pied à coulisse numérique dans l'axe dorso-plantaire au niveau du métatarse.

Pour tous les échantillons, les diamètres des pattes des rats ont été déterminés toutes les heures jusqu'à la 6^{ème} heure après l'injection de carragénine.

La différence entre les diamètres de patte pré et post-traitement indique le degré d'inflammation. L'œdème a été exprimé en pourcentage d'augmentation du diamètre de la patte suite à l'administration de carragénine par rapport à la patte de référence (patte non traitée). L'augmentation moyenne du diamètre des pattes de chaque groupe a été évaluée et comparée à celle des groupes témoin et standard.

1.2. Résultats

La mise en évidence de l'effet des extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* sur l'inflammation aiguë a été réalisée en utilisant le modèle de l'œdème de la patte induit par la carragénine. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 20** sous forme de moyenne arithmétique $\pm$ l'écart-type des pourcentages

d'œdème enregistrés pour chaque groupe. Le **tableau 20** présente aussi les résultats de la comparaison multiple par le test de Tukey entre les différents lots.

Comme le montre le **tableau 20**, la formation d'œdème de la patte chez le groupe témoin est apparue une heure après l'injection de carragénine et a continué à augmenter jusqu'à la 3^{ème} heure pour se stabiliser entre la 4^{ème} et la 6^{ème} heure. Comparativement au groupe témoin, une différence significative du pourcentage d'œdème a été révélée chez tous les groupes traités ($p < 0,0001$).

Tableau 20 : Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de *S. argel* sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.

Groupes	Dose (mg/kg)	Pourcentage d'œdème (%)						
		T _{0h}	T _{1h}	T _{2h}	T _{3h}	T _{4h}	T _{5h}	T _{6h}
Contrôle		0.29±0.03 ^a	0.57±0.01 ^a	0.65±0.01 ^a	0.46±0.02 ^a	0.37±0.01 ^a	0.36±0.01 ^a	0.36±0.01 ^a
Indométacine	10	0.29±0.0 ^a	0.47±0.03 ^{abc}	0.37±0.01 ^{bc}	0.22±0.00 ^{bcde}	0.12±0.01 ^{bcd}	0.09±0.00 ^{bc}	0.09±0.00 ^{bc}
SAAC	250	0.26±0.06 ^a	0.50±0.01 ^{abc}	0.41±0.01 ^b	0.28±0.01 ^b	0.18±0.00 ^b	0.12±0.01 ^b	0.11±0.01 ^b
SAAC	400	0.25±0.04 ^a	0.40±0.01 ^{bc}	0.32±0.00 ^{cd}	0.17±0.01 ^{cde}	0.09±0.01 ^d	0.07±0.01 ^{bc}	0.05±0.00 ^{bc}
SAME	250	0,23±0,08 ^a	0,38±0,09 ^c	0,25±0,05 ^d	0,17±0,04 ^{cde}	0,13±0,05 ^{bcd}	0,09±0,07 ^{bc}	0,09±0,06 ^{bc}
SAME	400	0,26±0,07 ^a	0,43±0,11 ^{bc}	0,27±0,11 ^d	0,16±0,08 ^{de}	0,09±0,05 ^d	0,07±0,05 ^{bc}	0,05±0,05 ^{bc}
SAAQ	250	0,28±0,03 ^a	0,49±0,04 ^{abc}	0,30±0,02 ^{cd}	0,22±0,01 ^{bcd}	0,16±0,02 ^{bc}	0,11±0,01 ^{bc}	0,09±0,02 ^b
SAAQ	400	0,29±0,01 ^a	0,47±0,04 ^{abc}	0,29±0,01 ^{cd}	0,19±0,02 ^{cde}	0,10±0,03 ^{cd}	0,09±0,03 ^{bc}	0,06±0,02 ^{bc}
SAHE	250	0,23±0,02 ^a	0,57±0,04 ^a	0,33±0,01 ^{bcd}	0,23±0,05 ^{bc}	0,15±0,08 ^{bc}	0,09±0,02 ^{bc}	0,08±0,01 ^{bc}
SAHE	400	0,23±0,02 ^a	0,50±0,02 ^{ab}	0,29±0,01 ^{cd}	0,14±0,02 ^e	0,07±0,02 ^d	0,05±0,02 ^c	0,03±0,02 ^c

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey

L'administration orale des extraits et de l'huile essentielle de *S. argel* aux doses testées a provoqué une inhibition dose et temps dépendante de la formation d'œdème entre la 2^{ème} et la 6^{ème} heure après l'injection de la carragénine, avec des taux d'inhibition allant de 63,31% à 89,83%, tout extrait confondu, observés à la 6^{ème} heure. De plus, le produit de référence indométacine a montré une réduction significative de l'œdème de la patte avec un taux d'inhibition de 75,7% enregistré à la 6^{ème} heure. Aucune différence significative des taux

d'inhibition n'a été enregistrée à la 6^{ème} heure pour tous les groupes testés, hormis le groupe traité par l'huile essentielle à la dose de 250 mg/kg.

2. Modèle de l'œdème de l'oreille induit par le xylène

2.1. Méthode

Le principe du test d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire selon le modèle de l'œdème de l'oreille de souris induit par le xylène consiste en l'application du xylène sur l'oreille dans le but d'induire grâce à sa propriété phlogistique une réaction inflammatoire locale aiguë.

Dix groupes de 6 souris chacun ont été traités respectivement avec SAAC (250 et 400 mg/kg), SAME (250 et 400 mg/kg), SAAQ (250 et 400 mg/kg), SAHE (250 et 400 mg/kg), indométacine (10 mg/kg) et l'eau distillée (10 ml/kg). Trente minutes après l'administration des traitements, l'œdème a été induit par l'application de 0,03 ml de xylène sur la surface interne de l'oreille droite de la souris, l'oreille gauche a servi de contrôle. Une heure après application du xylène, les souris ont été sacrifiées après une anesthésie à l'éther et des sections de peau circulaires de 8 mm de diamètre des oreilles gauche et droite ont été découpées à l'aide d'un punch à biopsie puis pesées. La mesure du degré d'œdème est exprimée par la différence de poids entre l'oreille traitée et non traitée (Xu *et al.*, 2014).

2.2. Résultats

Le test de l'œdème de l'oreille induit par le xylène a été réalisé afin d'évaluer l'action des extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle de *S.argel* sur une réaction inflammatoire locale aiguë. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 21** sous forme de moyenne arithmétique $\pm$ l'écart-type du taux d'œdème enregistré pour chaque lot ainsi que leur pourcentage d'inhibition. Le **tableau 21** présente aussi les résultats de la comparaison multiple par le test de Tukey entre les différents lots.

Les extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle de *S.argel* ainsi que le produit de référence indométacine ont enregistré, comme illustrés dans le **tableau 21**, une différence significative du pourcentage d'œdème comparativement au groupe témoin ($p < 0,0001$).

Tableau 21 : Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de *S. argel* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris.

Groupes	Dose (mg/kg)	Taux d'œdème	% réduction d'œdème (%)
Contrôle		0,51±0,02 ^a	-
Indométacine	10	0,13±0,03 ^{bc}	74,53±7,46 ^{ab}
SAAC	250	0,20±0,06 ^b	60,98±12,27 ^b
SAAC	400	0,07±0,08 ^c	85,22±16,20 ^a
SAME	250	0,13±0,05 ^{bc}	73,2±10,89 ^{ab}
SAME	400	0,07±0,09 ^c	85,67±17,04 ^a
SAAQ	250	0,20±0,02 ^b	60,13±4,53 ^b
SAAQ	400	0,08±0,04 ^c	84,34±7,76 ^a
SAHE	250	0,12±0,05 ^{bc}	75,6±11,03 ^{ab}
SAHE	400	0,05±0,06 ^c	90,11±11,86 ^a

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

Les extraits de *S. argel* aux doses testées ont entraîné un effet anti-inflammatoire dose-dépendant. De plus, à la dose de 250 mg/kg l'extrait acétonique a entraîné une réduction d'œdème similaire à celle de l'extrait aqueux avec des taux d'inhibition de 60,98 et 60,13 %, suivis de l'extrait méthanolique et de l'huile essentielle avec des pourcentage d'inhibition d'œdème de 73,2 et 75,6 % respectivement.

Par ailleurs, à la dose de 400 mg/kg, les extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que l'huile essentielle ont enregistré une activité anti-inflammatoire équivalente avec des taux d'inhibition de 85,22, 85,67, 84,34 et 90,11 % respectivement. Enfin, le produit de référence indométacine a présenté un effet anti-inflammatoire comparable à celui de l'extrait méthanolique et de l'huile essentielle à la dose de 250 mg/kg.

3. Modèle du granulome induit par les pellets de coton

3.1. Méthode

Le principe du test repose sur l'évaluation de la formation de granulome après implantation sous-cutanée de corps étrangers chez le rat. Les lésions granulomateuses ont été induites par implantation chirurgicale de deux pellets de coton par voie sous-cutanée dans la région dorsale des rats.

A cet effet, huit groupes de 6 rats chacun ont été traités respectivement avec SAAC (250 et 400 mg/kg), SAME (250 et 400 mg/kg), SAAQ (250 et 400 mg/kg), indométacine (10 mg/kg) et l'eau distillée (10 ml/kg). Vingt (20) min après administration des traitements, deux pellets de coton stériles, pesant chacun 20 mg, ont été implantés de manière aseptique dans l'espace inter-scapulaire, un près de chaque scapula.

Les animaux ont été traités quotidiennement pendant 7 j. Au huitième jour, les rats ont été sacrifiés et les pellets de coton entourés de tissu granulomateux ont été soigneusement disséqués puis séchés à $70 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les pellets ont été pesés avant et après séchage et le poids moyen du tissu de granulation formé a été déterminé. Les poids des pellets prélevés sur les rats traités ont été comparés à ceux prélevés sur les rats des groupes témoin et standard (**Sengar et al., 2015**).

3.2. Résultats

L'évaluation de l'effet antiprolifératif des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* s'est faite en utilisant le modèle du granulome induit par les pellets de coton. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 22** sous forme de moyennes arithmétiques $\pm$ l'écart-type des poids des pellets de coton aux états humide et sec enregistrés pour chaque lot ainsi que leur pourcentage d'inhibition. Le tableau 22 présente aussi les résultats de la comparaison multiple par le test de Tukey entre les différents lots.

Les extraits de *S. argel* aux doses testées ainsi que le produit de référence indométacine ont entraîné une inhibition significative de la formation de granulome comparativement au groupe témoin ($p < 0,0001$).

Tableau 22 : Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) des feuilles de *S. argel* sur le granulome induit par les pellets de coton chez le rat.

Groupes	Dose (mg/kg)	Poids des pellets de coton (mg) (humides)	% inhibition	Poids des pellets de coton (mg) (secs)	% inhibition
Contrôle		530,97±39,78 ^a	-	103,56±2,91 ^a	-
Indométacine	10	167,04±16,67 ^b	68,46 ^a	32,18±6,55 ^b	68,78 ^a
SAAC	250	269,11±19,71 ^c	49,29 ^b	49,02±5,36 ^c	52,63 ^b
SAAC	400	170,41±1,75 ^b	67,74 ^a	30,44±1,02 ^b	70,58 ^a
SAME	250	220,49±13,62 ^d	54,44 ^b	35±1,11 ^e	66,20 ^a
SAME	400	139,35±0,90 ^b	69,83 ^a	20±0,004 ^d	80,67 ^c
SAAQ	250	268,09±2,67 ^{cd}	49,24 ^b	48,18±1,87 ^b	53,47 ^b
SAAQ	400	171,83±2,49 ^b	67,46 ^a	31,02±1,69 ^e	70,01 ^a

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

L'effet anti-inflammatoire des extraits des feuilles de *S. argel* ainsi que celui du produit de référence indométacine ont été évalués sur la base des poids des pellets de coton aux états humide et sec. A l'état humide, les extraits acétonique, méthanolique et aqueux ont présenté un effet antiprolifératif équivalent à la dose de 250 mg/kg avec des taux d'inhibition respectifs de 49,29, 54,44 et 49,24 %, il en est de même pour la dose de 400 mg/kg avec des pourcentages d'inhibition de la formation de granulome de 67,74, 69,83 et 67,46 % respectivement.

A l'état sec, les extraits acétonique et aqueux ont montré, à la dose de 250 mg/kg, une action antiproliférative similaire avec des pourcentages d'inhibition de 52,63 et 53,47 %. Par ailleurs, le produit de référence indométacine et les extraits acétonique et aqueux à la dose de 400 mg/kg ont présenté un effet antiprolifératif équivalent, comparable à celui enregistré par l'extrait méthanolique à la dose de 250 mg/kg, avec des taux d'inhibition de 68,78, 70,58, 70,01 et 66,20 %, respectivement. Enfin, l'extrait méthanolique, à la dose de 400 mg/kg, a entraîné une action antiproliférative supérieure à celle du produit de référence et des autres extraits testés en enregistrant un taux d'inhibition de 80,67 %.

4. Discussion

L'inflammation ou réaction inflammatoire est un mécanisme physiologique mis en œuvre par l'organisme lorsque ce dernier subit une agression (chimique, toxique, microbienne, traumatique...). Néanmoins, dans le cas où cette réponse inflammatoire n'est pas contrôlée et/ou persiste dans la durée, la réaction inflammatoire devient défavorable et doit être contrôlée par des substances anti-inflammatoires. Dans ce contexte, les plantes médicinales et leurs composés isolés sont utilisés depuis des millénaires en médecine traditionnelle pour traiter différentes affections inflammatoires.

L'effet anti-inflammatoire des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que celui de l'huile essentielle de *S. argel* a été mis en évidence par les trois modèles expérimentaux mis en œuvre, à savoir, le modèle de l'œdème de la patte de rat induit par la carragénine, le modèle de l'œdème de l'oreille induit par le xylène et le modèle du granulome induit par les pellets de coton.

Le modèle de l'œdème de la patte de rat induit par la carragénine est un test largement utilisé pour évaluer l'activité anti-inflammatoire (**Di Rosa et al., 1971**). La carragénine est un agent phlogistique connu pour produire une réponse biphasique (**Vinegar et al., 1969**).

En effet, des études sur la libération de substances actives au cours de la réaction inflammatoire induite par la carragénine, ont montré que la première phase de l'œdème a lieu entre 0 et 2 heures après l'injection de la carragénine est attribuée à la libération d'histamine et de la 5-hydroxytryptamine, tandis que, la deuxième phase se produit entre 3 et 6 heures après l'injection de la carragénine. Cette seconde phase est régie par des substances de type prostaglandines, en particulier celles de la série E. Le précurseur des prostaglandines et des thromboxanes est le PGH₂, dérivé de l'acide arachidonique par l'action des cyclooxygénases (COX). Par ailleurs, la continuité entre deux phases est maintenue par des substances de type kinine, notamment la bradykinine produite par la kallicréine (**Di Rosa et al., 1971; Vinegar et al., 1987**).

Les extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que l'huile essentielle de *S. argel*, aux deux doses testées, ont conduit à une réduction significative de la formation d'œdèmes entre la 2^e et la 6^e heure après l'injection de la carragénine. Ce résultat montre que ces extraits ainsi que l'huile essentielle sont efficaces tout au long de la phase intermédiaire et de la seconde phase de la réponse inflammatoire. Par conséquent, leur activité anti-inflammatoire peut être due à l'inhibition de la libération de médiateurs inflammatoires se produisant pendant les

phases intermédiaire et secondaire de la formation de l'œdème, comme la bradykinine et les prostaglandines.

L'œdème de l'oreille induit par le xylène est un test utilisé pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire aigüe. En effet, l'application du xylène sur l'oreille de la souris provoque une irritation instantanée responsable d'une accumulation de liquide, donnant naissance à un œdème caractéristique de la réponse inflammatoire aigüe (**Okoli et al., 2007**). L'application locale du xylène est à l'origine d'une inflammation dite neurogénique. Le mécanisme cellulaire de l'inflammation neurogénique induite par le xylène fait appel à des neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine, qui sous l'effet d'un stimulus libèrent des substances potentielles initiatrices de la réaction inflammatoire. Il est prouvé que le peptide lié au gène de la calcitonine et la substance P sont les initiateurs majeurs de l'inflammation neurogénique (**Rotelli et al., 2003**). Ces derniers agissent en interagissant avec les cellules endothéliales, les mastocytes, les cellules immunitaires et les artérioles. De plus, il est reconnu que les neurones sensoriels contiennent des cyclooxygénases et sont capables de synthétiser des prostaglandines pro-inflammatoires (**Richardson et Vasko, 2002**).

L'huile essentielle ainsi que les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* ont entraîné une diminution significative de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris aux deux doses testées. Cet effet anti-œdémateux pourrait être le résultat de l'inhibition de la libération de la substance P et du peptide lié au gène de la calcitonine ou de la synthèse de prostaglandines pro-inflammatoires (**Rotelli et al., 2003**).

Le modèle du granulome induit par les pellets de coton est largement utilisé pour évaluer les composants transsudatifs et prolifératifs de l'inflammation chronique (**Winter et Porter, 1957**). L'inflammation chronique est caractérisée par une infiltration de monocytes, une prolifération de fibroblastes, une angiogenèse et une exsudation (**Meshram et al., 2016**). Le poids des pellets de coton humides est en corrélation avec le transsudat et le poids des granulés secs est en corrélation avec la quantité de tissu granulomateux. Les extraits acétonique, méthanolique et aqueux aux deux doses testées (250 et 400 mg / kg) ont montré une inhibition significative de la formation de granulome sur les pellets de coton. Ce résultat indique que ces extraits ont présenté une activité anti-inflammatoire au cours de la phase chronique de l'inflammation. Cette diminution de la formation de granulome reflète leur efficacité à réduire le niveau accru de fibroblastes et de la synthèse de collagène, qui sont des événements prolifératifs naturels de la formation du tissu de granulation (**Sengar et al., 2015**).

L'effet anti-inflammatoire des extraits acétonique, méthanolique et aqueux des feuilles de *S. argel* pourrait être attribué à l'action de leurs flavonoïdes majoritaires et communs à leur composition, à savoir, l'apigénine, la rutine, le kaempferol-3-*O*-rutinoside, le kaempferol-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside et kaempferol. Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer les actions anti-inflammatoires des flavonoïdes *In vivo*, comme l'activité antioxydante, l'inhibition des enzymes génératrices d'eicosanoïdes ou la modulation de la production de molécules pro-inflammatoires (**Garcia-Lafuente et al., 2009**).

Le kaempferol et certains de ses glycosides ont un large éventail d'activités pharmacologiques, y compris un effet anti-inflammatoire (**Tsai et al., 2018**). Le kaempferol peut agir comme anti-inflammatoire en se liant au NF- κ B et cibler différents sites de la voie NF- κ B (**Kadioğlu et al., 2015**). Sachant que le NF- κ B est un facteur de transcription ayant un rôle clé dans l'inflammation puisqu'il est responsable de l'expression de divers gènes pro-inflammatoires et prolifératifs, tels que les facteurs de nécrose tumorale des interleukines, les interférons et les cyclooxygénases (**Kadioğlu et al., 2015**). La rutine pourrait être un candidat potentiel pour l'inhibition de la COX-2 avec un mécanisme d'action unique et pourrait également inhiber la transcription de plus de 20 gènes codant pour des facteurs pro-inflammatoires critiques, incluant le TNF- α , l'IL-1, l'IL-8 ainsi que le facteur inhibiteur de migration (**Chua, 2013**).

Par ailleurs, les extraits acétonique et méthanolique de *S. argel* possèdent un flavonoïde en commun, le kaempferol-3-*O*-glucoside (astragaline), qui pourrait participer à l'effet anti-inflammatoire observé. L'astragaline a été rapportée comme un agent anti-inflammatoire efficace. En effet, l'étude menée par Lee et al (2011) sur la démonstration des propriétés anti-inflammatoires de l'astragaline a montré une inhibition significative de la production cellulaire de NO, PGE2 et IL-6 (**Lee et al., 2011**).

De même, le kaempferol-3-*O*-feruloyldihexoside-7-*O*-rhamnoside et la quercétine-*O*-feruloyl-hexoside, présents dans l'extrait aqueux de *S. argel* pourraient également contribuer à l'activité anti-inflammatoire enregistrée.

L'effet anti-inflammatoire enregistré peut également être dû à la présence dans les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* de saponines. En effet, l'activité anti-inflammatoire des saponines est connue depuis longtemps et est étroitement liée à l'aglycone de base (**Barbosa, 2014**).

Les mécanismes considérés pour l'activité anti-inflammatoire des saponines comprennent l'activité corticomimétique inhibant la dégradation du glucocorticoïde de libération des médiateurs de l'inflammation, l'inhibition de la formation d'enzymes et l'inhibition de l'augmentation de la perméabilité vasculaire **(Matsuda et al., 1990)**. Il a été démontré que les effets de type glucocorticoïde des saponines antagonisent le facteur de transcription NF- κ B, sachant que NF- κ B régule un certain nombre de gènes impliqués dans les voies immunitaires et inflammatoires telles que diverses cytokines pro-inflammatoires et molécules d'adhésion **(Haridas et al., 2001)**.

L'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *S. argel* peut être attribué à son composé majoritaire le linalol, comme il peut être le résultat d'une action synergique entre plusieurs de ses composés.

Plusieurs études sur des modèles animaux ont montré que le linalol provoque une inhibition significative de l'œdème induit par la carragénine **(Aprotosoie et al., 2014)**. En effet, le linalol agit de manière anti-œdémateuse, limitant la réponse inflammatoire et ses modifications histologiques associées **(Huo et al., 2013)**. Les mécanismes suggérés par les études *In vitro* et *In vivo* montrent que le linalol peut agir en inhibant la production de cytokines inflammatoires via le blocage des voies NF- κ B et MAP Kinase, en antagonisant les effets NMDA et en réduisant la synthèse ou la libération de l'oxyde nitrique **(Peana et al., 2002; Aprotosoie et al., 2014)**. La capacité à réduire l'œdème induit par la carragénine peut également être liée à l'effet inhibiteur de ce monoterpène sur divers systèmes de transmission tels que le glutamate, l'acétylcholine, les canaux K⁺, la dopamine et les opioïdes **(Peana et al., 2004 a)**.

Par ailleurs, l' α -terpineol présent dans la composition de l'huile essentielle de *S. argel* pourrait également contribuer à l'effet anti-inflammatoire observé. Cet effet pourrait être associé à la capacité de l' α -terpineol à inhiber la cascade de cytokines générée par la carragénine et/ou à diminuer la production des médiateurs inflammatoires tel que l'inhibition de la libération de l'oxyde nitrique (NO) par des mécanismes dépendant de l'inhibition du NF- κ B **(Oliveira et al., 2012)**.

Pareillement, le géraniol, autre composant de l'huile essentielle de *S. argel*, pourrait participer à l'activité anti-inflammatoire rapportée. Effectivement, une étude sur l'effet protecteur du géraniol au cours des lésions traumatiques de la moelle épinière, a permis de mettre en évidence l'action anti-inflammatoire du géraniol. Cette action serait due à une diminution par

le géraniol des niveaux sériques des cytokines inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6 (**Wang et al., 2016**). Le nerol, cis-isomère du géraniol, présent dans l'huile essentielle de *S. argel* pourrait également participer à l'effet anti-inflammatoire enregistré. En effet, l'effet anti-inflammatoire du nerol serait dû à une réduction de l'expression et/ou des niveaux d'interleukines telles que IL-1 β , IL-6, TNF- α et IFN- γ ainsi que l'inhibition d'autres médiateurs pro-inflammatoires dont iNOS, COX-2, MCP-1 et le blocage de la translocation nucléaire du NF κ B (**González-Ramírez et al., 2016**).

Le limonène pourrait aussi contribuer à l'activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle de *S. argel* en inhibant les médiateurs pro-inflammatoires et le chimiotactisme des leucocytes, avec l'implication de cytokines inflammatoires, telles que le TNF- α (**Kummer et al., 2013**). Enfin, la présence du terpinolène dans la composition de l'huile essentielle de *S. argel* pourrait participer à l'effet anti-inflammatoire rapporté. En effet, une étude a permis de mettre en évidence que l'activité anti-inflammatoire du terpinolène serait due à l'inhibition de l'expression des cytokines IL-1 β et TNF- α (**Macedo et al., 2016**).

5. Conclusion

La présente étude a permis de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de l'huile essentielle et des extraits de *S. argel* sur l'inflammation aigüe et chronique.

Activité Antalgique

Activité antalgique

Afin d'évaluer l'effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et de l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de *S. argel* sur la douleur, les trois modèles expérimentaux suivants ont été mis en œuvre.

1. Test de Writhing

1.1. Méthode

Le test de Writhing consiste en l'évaluation de l'activité antalgique périphérique vis à vis de la douleur chimique provoquée par l'injection de l'acide acétique par voie intra-péritonéale chez la souris. Ce syndrome douloureux se manifeste par des mouvements de torsion de la musculature dorso-abdominale avec étirement des pattes postérieures (crampes) (**Koster et al., 1959**).

Dix groupes, de 6 souris chacun, ont été traités respectivement avec SAAC (250 et 400 mg/kg), SAME (250 et 400 mg/kg), SAAQ (250 et 400 mg/kg), SAHE (250 et 400 mg/kg), l'indométacine (10 mg/kg) et l'eau distillée (10 ml/kg). Trente minutes après traitement, 0,1 ml d'une solution d'acide acétique à 1% a été administrée aux souris par voie intra-péritonéale induisant des crampes caractéristiques. Après un temps de latence de 5 min, le comptage des crampes est effectué pendant une période de 20 min par observation directe des souris séparées chacune dans une cage individuelle. La réduction du nombre de crampes des groupes traités est comparée à celle des groupes standard et contrôle. Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante :

$$\%Inhibition = \frac{\text{Nombre de torsions du témoin} - \text{nombre de torsions du groupe}}{\text{Nombre de torsions du témoin}} \times 100$$

1.2. Résultats

L'évaluation de l'effet des extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* sur la douleur périphérique a été réalisée en utilisant le test de Writhing. Les résultats obtenus sont présentés dans **le tableau 23** sous forme de moyenne arithmétique $\pm$ l'écart-type du nombre de torsions enregistré pour chaque lot ainsi que leur taux

d'inhibition. Le **tableau 23** présente aussi les résultats de la comparaison multiple par le test de Tukey entre les différents lots.

Tableau 23 : Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de *S. argel* sur les crampes abdominales induites par l'acide acétique chez la souris.

Groupes	Dose (mg/kg pc.)	Nombre de torsions	% inhibition
Contrôle		57,83±4,79 ^a	-
Indométacine	10	12,16±1,83 ^{be}	78,93 ^{ac}
SAAC	250	24,83±1,33 ^c	56,83 ^b
SAAC	400	11,33±2,06 ^{be}	80,41 ^{ac}
SAME	250	20,33±2,58 ^{cd}	64,66 ^{bd}
SAME	400	6,66±5,16 ^{ef}	88,15 ^{ae}
SAAQ	250	24,33±0,51 ^c	57,62 ^b
SAAQ	400	11,5±2,34 ^{be}	80,11 ^{ac}
SAHE	250	15,66±2,33 ^{bd}	72,71 ^{cd}
SAHE	400	4,33±5,16 ^f	92,41 ^e

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

Les extraits de *S. argel* aux doses testées ainsi que le produit de référence l'indométacine ont entraîné une inhibition significative de la réponse de contractions abdominales induites par l'acide acétique comparativement au groupe témoin. De plus, les extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle de *S. argel* ont présenté un effet antinociceptif dose-dépendant aux doses de 250 et 400 mg/kg.

Par ailleurs, à la dose de 250 mg/kg, l'extrait acétonique a présenté un effet protecteur similaire à celui de l'extrait aqueux avec des pourcentages d'inhibition des crampes de 56,83 et 57,62 %, suivi de l'extrait méthanolique et l'huile essentielle avec des taux d'inhibition de 64,66 et 72,71 %, respectivement.

Enfin, à la dose de 400 mg/kg ; les extraits acétonique et aqueux ainsi que le standard indométacine ont enregistré une activité antinociceptive similaire avec des taux d'inhibition de 80,41, 80,11 et 78,93 % respectivement, comparable à celle de l'huile essentielle à la dose

de 250 mg/kg ; suivi par l'extrait méthanolique et l'huile essentielle avec des pourcentages de réduction de la douleur de 88,15 et 92,41 %, respectivement.

2. Test au formaldéhyde

2.1. Méthode

Le test au formaldéhyde sur rats est un modèle d'évaluation de l'activité antalgique vis à vis d'une douleur chronique sensible aux antalgiques centraux. Le test a été réalisé selon la méthode décrite par **Hunikaar et Hole (1987)**.

Dix groupes de 6 rats chacun ont été traités oralement avec SAAC (250 et 400 mg/kg), SAME (250 et 400 mg/kg), SAAQ (250 et 400 mg/kg), SAHE (250 et 400 mg/kg), morphine (10 mg/kg) et l'eau distillée (10 ml/kg), respectivement. Une heure après administration des traitements, un volume de 50µl d'une solution de formaldéhyde à 2,5% a été injectée dans le coussinet plantaire de la patte arrière droite des rats. Puis, les rats ont été placés en observation dans des cages individuelles.

L'effet anti-nociceptif a été mis en évidence par la détermination de la durée du léchage et de la levée de la patte lésée. La constatation de la réponse douloureuse s'est faite en deux phases, une première phase dite neurogénique, où les rats sont observés de 0 à 5 min et une seconde phase dite inflammatoire où les rats sont observés de 20 à 25 min après injection du formaldéhyde.

Le pourcentage d'inhibition de la douleur est calculé selon la formule suivante :

$$\%Inhibition = \frac{\text{Durée du léchage de la patte témoin} - \text{Durée du léchage de la patte du groupe}}{\text{Durée de léchage de la patte témoin}} \times$$

2.2. Résultats

La mise en évidence de l'effet des extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* sur la douleur chronique a été réalisée en utilisant le test au formaldéhyde. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 24** sous forme de moyenne arithmétique $\pm$ l'écart-type de la durée de léchage de la patte enregistrée pour chaque groupe ainsi que leur taux d'inhibition. Le **tableau 24** présente aussi les résultats de la comparaison multiple par le test de Tukey entre les différents lots.

Tableau 24 : Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de *S. argel* sur la douleur induite par le formaldéhyde chez le rat.

Groupes	Dose (mg/kg)	Intensité de la douleur		% inhibition	
		Phase 1	Phase 2	Phase 1	Phase 2
Contrôle		3±0.0 ^a	3±0.0 ^a		
Morphine	10	0±0.0 ^b	0,33±0.51 ^b	100 ^a	88,9 ^a
SAAC	250	2±0.63 ^c	1,33±0.51 ^b	33,3 ^d	55,6 ^a
SAAC	400	1±0.63 ^{cde}	0,5±0.54 ^b	66,7 ^{bcd}	83,3 ^a
SAME	250	1,83±0,75 ^{cd}	1±1,09 ^b	39,9 ^{bcd}	66,7 ^a
SAME	400	1,5±0,54 ^{cde}	0,66±0,81 ^b	50 ^{cd}	77,8 ^a
SAAQ	250	2±0,63 ^c	1,5±0,54 ^b	33,3 ^d	50 ^a
SAAQ	400	1,33±0,51 ^{de}	0,66±0,81 ^b	55,6 ^{bc}	77,8 ^a
SAHE	250	1,33±0,51 ^{cde}	1,16±0,4 ^b	55,6 ^{bcd}	61,1 ^a
SAHE	400	0,66±0,51 ^{be}	0,33±0,51 ^b	77,8 ^{ab}	88,9 ^a

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey

Les extraits et l'huile essentielle de *S. argel* ainsi que le standard morphine ont entraîné une réduction significative de la douleur induite par le formaldéhyde au cours des deux phases du test comparativement au groupe témoin. De plus, les extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle de *S. argel* ont présenté un effet antinociceptif dose-dépendant aux doses de 250 et 400 mg/kg.

Au cours de la phase neurogénique, les extraits acétonique et aqueux ont présenté un effet anti-nociceptif équivalent à la dose de 250 mg/kg avec un pourcentage d'inhibition de 33,3 %, suivis de l'extrait méthanolique et l'huile essentielle avec des taux d'inhibition de 39,9 et 55,5%. De plus, les extraits acétonique, méthanolique et aqueux ont enregistré, à la dose de 400 mg/kg, une activité antinociceptive comparable à celle de l'huile essentielle à la dose de 250 mg/kg. L'effet antinociceptif obtenu suite à l'administration de l'huile essentielle à la dose de 400 mg/kg est similaire à celui du standard morphine avec un taux de réduction de la

douleur de 77,8 %. Par ailleurs, aucune différence significative n'a été rapportée entre les différents groupes testés au cours de la seconde phase dite inflammatoire.

Enfin, le produit de référence, la morphine (10 mg/kg), a montré une puissante activité antinociceptive au cours des deux phases avec des taux d'inhibition de 100 et 88,9%, respectivement.

3. Test à la plaque chauffante

3.1. Méthode

Le principe de ce test consiste en l'évaluation de l'activité antalgique centrale des substances à tester en exposant les pattes des souris à un stimulus thermique. Pour ce faire, dix groupes de 6 souris chacun ont été traités respectivement avec SAAC (250 et 400 mg/kg), SAME (250 et 400 mg/kg), SAAQ (250 et 400 mg/kg), SAHE (250 et 400 mg/kg), la morphine (10 mg/kg) et l'eau distillée (10 ml/kg).

Les souris de tous les groupes ont été exposées individuellement à un stimulus thermique en les plaçant sur une plaque chauffante réglée à 55 ± 1 C°. Le temps de réaction est mesuré en secondes à l'aide d'un chronomètre, en prenant en compte les réflexes de saut et de retrait ou de léchage des pattes. La détermination du seuil nociceptif s'est faite par la réalisation de cinq mesures successives à 30 min d'intervalle, à savoir : 0 min, 30 min, 60 min, 90 min et 120 min (**Tasleem et al, 2014**).

3.2. Résultats

L'estimation de l'effet des extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* sur la douleur centrale a été effectué en utilisant le test à la plaque chauffante. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 25** sous forme de moyenne arithmétique $\pm$ l'écart-type du temps de latence enregistré pour chaque groupe ainsi que leur taux d'inhibition. Le **tableau 25** présente aussi les résultats de la comparaison multiple par le test de Tukey entre les différents lots.

Tableau 25 : Effet des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME), aqueux (SAAQ) et l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de *S. argel* sur la douleur centrale induite par un stimulus thermique chez la souris.

Groupes	Dose (mg/kg)	Temps de latence (secondes)			
		T _{30min}	T _{60min}	T _{90min}	T _{120min}
Contrôle		5,38±0.08 ^a	5,45±0.05 ^a	5,34±0.08 ^a	5,33±0.08 ^a
Morphine	10	30,19±0.14 ^b	30,9±0.04 ^b	30,09±0.01 ^b	30,05±0.04 ^b
SAAC	250	7,81±0.13 ^c	8,99±0.46 ^c	7,11±0.21 ^{ac}	6,18±0.38 ^{ac}
SAAC	400	11,78±0.48 ^d	13,59±0.86 ^d	9,77±0.97 ^d	7,49±0.84 ^{cd}
SAME	250	8,9±0,5 ^e	16,11±1,54 ^d	11,27±1,51 ^e	7,9±0,95 ^d
SAME	400	15,48±1,41 ^c	26,64±1,7 ^e	19±2,19 ^d	12,21±1,62 ^e
SAAQ	250	8,91±1,11 ^c	15,58±0,88 ^d	9,28±1,06 ^{cd}	7,29±0,72 ^{cd}
SAAQ	400	13,15±0,72 ^d	22,09±3,47 ^f	11,42±1,54 ^d	8,03±0,78 ^d
SAHE	250	12,44±0,82 ^d	15,56±0,26 ^d	9,34±0,44 ^{cd}	8,29±0,48 ^d
SAHE	400	30,02±1,24 ^b	30,38±0,34 ^b	20,82±1,42 ^e	17,84±0,94 ^f

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

Les extraits et l'huile essentielle de *S.argel* ainsi que le standard morphine ont entraîné une réduction significative de la douleur centrale comparativement au groupe témoin.

L'effet anti-nociceptif enregistré pour les extraits acétonique, méthanolique, aqueux et l'huile essentielle de *S.argel* est dose et temps dépendant. Les extraits acétonique, méthanolique et aqueux ont présenté à la dose de 250 mg/kg une activité anti-nociceptive équivalente, le même constat a été fait pour la dose de 400 mg/kg pour lesquels l'effet anti-nociceptif est comparable à celui de l'huile essentielle à la dose de 250 mg/kg. Par ailleurs, l'huile essentielle a enregistré à la dose de 400 mg/kg une forte activité anti-nociceptive aux temps de mesure de 30 et 60 min similaire à celle de la morphine, pour ensuite diminuer légèrement aux temps de 90 et 120 min. En revanche, la morphine (10 mg/kg), utilisée ici comme produit de référence, a considérablement prolongé le temps de latence et a montré un puissant effet anti-nociceptif tout au long du test.

Les extraits et l'huile essentielle de *S.argel*, aux deux doses testées (250 et 400 mg/kg), ont présenté une activité anti-nociceptive maximale enregistrée à la 6^{ème} heure. En effet, les extraits méthanolique et aqueux ainsi que l'huile essentielle ont montré, à la dose de 250 mg/kg, un effet anti-nociceptif équivalent avec des taux d'inhibition de 65,9, 64,9, 64,9% respectivement, suivis de l'extrait acétonique avec un pourcentage d'inhibition de 39,2% à la même dose.

A la dose de 400 mg/kg, l'extrait méthanolique et l'huile essentielle de *S.argel* ont enregistré une puissante activité anti-nociceptive similaire à celle du standard morphine, avec des taux de réduction de la douleur centrale de 79,5, 82 et 82,3% respectivement, suivi de l'extrait acétonique avec un taux d'inhibition de 59,7%.

Les résultats issus de nos investigations ont été documentées dans un article inédit intitulé :
« Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive effects of acetone extract of algerian *Solenostemma argel* (DELILE) Hayne eaves » dans la revue International Journal of Current Pharmaceutical Research en 2020

4. Discussion

L'étude de l'activité anti-nociceptive des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que de l'huile essentielle de *S. argel* a été réalisée selon trois modèles expérimentaux, à savoir, le test de torsions abdominales induites par l'acide acétique chez la souris, le test au formaldéhyde chez le rat et le test de la plaque chauffante chez la souris.

Le test de writhing chez la souris est une méthode chimique utilisée dans le but de provoquer une douleur périphérique par injection intra-péritonéale d'une substance irritante comme l'acide acétique. L'effet analgésique des médicaments testés est inversement proportionnel à la fréquence des torsions observées. Les données présentées dans le **tableau 22** ont indiqué que les extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que l'huile essentielle de *S.argel* aux deux doses (250 et 400 mg/kg) testées réduisaient significativement la douleur chimique induite par l'acide acétique chez la souris d'une manière dose-dépendante. L'injection intrapéritonéale d'acide acétique provoque la libération de prostanoïdes, en particulier la PGE2, la PGF2, la bradykinine, la sérotonine et la lipoxigénase dans les fluides péritonéaux (**Bhattacharya et al., 2014**).

Les prostaglandines activent et sensibilisent les récepteurs nociceptifs chimio-sensibles périphériques, conduisant à l'induction de torsions abdominales accompagnées d'une extension des membres antérieurs et d'un allongement du corps (**Zhao et al., 2012**). Par conséquent, l'activité anti-nociceptive des extraits et de l'huile essentielle de *S.argel* peut être due à une inhibition de la synthèse des prostaglandines.

Le test au formol est un modèle valide et fiable de nociception et est sensible à diverses classes de médicaments analgésiques (**Temponi et al., 2012**). Ce test produit une réponse nociceptive biphasique distincte, qui peut être séparée dans le temps (**Wang et al., 2014 (b)**). En effet, la première phase (de 0 à 5min après l'injection de formol) résulte d'une stimulation directe des nocicepteurs. Durant cette phase, la douleur est dite non inflammatoire et serait due à l'action de la substance P, du glutamate et de la bradykinine. Par ailleurs, la deuxième phase (de 15 à 30 min) est une réponse inflammatoire où la douleur est associée à un processus dans lequel plusieurs médiateurs inflammatoires seraient impliqués, notamment l'histamine, la sérotonine, les prostaglandines et la bradykinine (**Hunnskaar et Hole, 1987; Zhao et al., 2012; Xu et al., 2014**).

Les extraits et l'huile essentielle de *S.argel* ont montré un effet dose-dépendant significatif sur les deux phases de la douleur induite par le formol par rapport au groupe témoin. Les données obtenues à la suite du test au formol corroborent celles obtenues au test de la plaque chauffante et au test de torsions. Cette propriété peut être due à l'inhibition de la synthèse ou de l'action de la kinine et des prostaglandines.

Le test de la plaque chauffante est utilisé pour l'évaluation des analgésiques à action centrale, en entraînant une douleur par l'application d'un stimulus thermique chez les souris (**Hiruma-Lima et al., 2000**) mesurant ainsi la réponse complexe à une douleur aiguë non-inflammatoire (**Zakaria et al., 2008**). Ce test a souvent été utilisé pour évaluer l'activité anti-nociceptive centrale en raison de ses nombreux avantages, notamment sa sensibilité aux analgésiques puissants et les lésions tissulaires minimales qu'il entraîne (**Zhao et al., 2012**).

Les extraits et l'huile essentielle de *S.argel* ont produit un effet dose dépendant significatif sur la latence de la douleur avec des taux d'inhibition maximaux enregistrés à 60 min, comparativement au groupe témoin. Cette action anti-nociceptive confirme l'activité centrale observée lors de la première phase du test au formol. De plus, le médicament standard,

morphine, analgésique à action centrale exerçant une action sur les récepteurs opioïdes, a été associée à un effet anti-nociceptif très significatif, avec un taux d'inhibition de 82,33%.

L'étude menée a démontré l'effet analgésique des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que celui de l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* sur les douleurs périphériques et centrales, ce qui suggère la présence dans ces extraits de composés à pouvoir anti-nociceptif qui pourraient agir sur les voies de la kinine et des prostaglandines. Il a été découvert que plusieurs flavonoïdes isolés de plantes médicinales possédaient des effets analgésiques et anti-inflammatoires importants (**Eldahshan et Abdel-Daim, 2014**). L'activité analgésique enregistrée peut être due à la présence dans les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de certains flavonoïdes tels que la rutine, le kaempférol-3-O-rutinoside, le kaempférol-3-O-glucoside et le kaempférol. En effet, une étude antérieure a permis de démontrer l'effet anti-nociceptif du kaempférol-3-O-rutinoside et du kaempférol-3-O-glucoside dans différents tests anti-nociceptifs, y compris le test de torsions induites par l'acide acétique et le test au formol (**Wang et al., 2014 (b)**).

D'autres travaux ont révélé l'activité analgésique potentielle des deux flavonoïdes kaempférol et kaempférol-3-O-glucoside sur la douleur périphérique selon le modèle des torsions induites par l'acide acétique (**Parveen et al., 2007**). De plus, une étude récente a fourni la preuve que la rutine produit des effets antinociceptifs systémiques impliquant la modulation centrale du circuit descendant de la matière grise périaqueducule ventrolatérale (vIPAG), où cette action pharmacologique est partiellement médiée par un mécanisme opioïdégique (**Hernandez-Leon et al., 2016**).

De plus, l'effet analgésique de la rutine a été étudié par le test à la plaque chauffante sur des souris albinos suisses où l'effet analgésique de la rutine a été établi. En outre, il a également été confirmé que la rutine présentait des activités anti-nociceptives périphériques et centrales (**Ganeshpurkar et Saluja, 2016**). L'effet antinociceptif peut également être attribué à la présence d'acide salicylique dans les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel*. En effet, l'acide salicylique peut contribuer à la modulation de la douleur en inhibant les réactions induites par les cytokines, l'interaction des salicylates avec les protéines de choc thermique, et influe sur l'expression génétique des protéines associées à l'inflammation (**Steen et al., 1995**). De plus, l'acide salicylique modifie de manière covalente les COX en acétylant un résidu sérine positionné dans le canal de liaison à l'acide arachidonique de l'enzyme

(Ser529 de COX-1 et Ser516 de COX-2), l'inactivant ainsi de manière irréversible et empêchant la génération de prostaglandines et de thromboxane A2 (**Corazzi et al., 2005**).

La présence de dérivés de saponine dans les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S.argel* peut également être à l'origine de l'effet analgésique observé. En effet, plusieurs études ont démontré l'effet analgésique des saponines sur la douleur périphérique et centrale à l'aide du test de writhing, du test au formol et du test de la plaque chauffante (**Choi et al., 2005; Arrau et al., 2011; Yassin et al., 2013; Saleh et al., 2015**). De nombreuses saponines testées ont montré une activité antinociceptive significative probablement en raison de leur fraction non glycosidique, la sapogénine (**Arrau et al., 2011**). Le mécanisme suggéré dans l'activité analgésique des saponines implique le blocage de la libération de la bradykinine, de la prostaglandine et des cytokines (**Saleh et al., 2015**).

L'effet anti-nociceptif de l'huile essentielle de *S.argel* peut être attribué à l'action de son composé majoritaire, le linalol, ou alors à l'action synergique de ses principaux composés.

Plusieurs études *In vivo* confirment les propriétés anti-nociceptives du linalol. En effet, une étude a permis de mettre en évidence l'effet anti-nociceptif du linalol aussi bien sur la douleur inflammatoire induite par l'acide acétique au cours du test de writhing, que sur la douleur neurogénique lors du test à la plaque chauffante (**Peana et al., 2003**). Ils ont également démontré l'effet anti-nociceptif du linalol sur la douleur induite par le formol au cours des phases du test au formaldéhyde (**Peana et al., 2004(b)**).

Les propriétés anti-nociceptives du linalol ont été principalement attribuées à l'interférence positive de la transmission opioïdergique, dopaminergique et muscarinique ainsi qu'à la modulation négative de la transmission glutamatergique (**Aprotosoie et al., 2014**). En effet, l'activité anti-nociceptive exercée par le linalol au cours du test de writhing semble dépendre à la fois de la neurotransmission opioïdergique et cholinergique ; alors que lors du test à la plaque chauffante, le linalol semble activer différents mécanismes tels que la transmission muscarinique, via les récepteurs M2, la transmission opioïdergique et la transmission dopaminergique, via les récepteurs D2 ainsi que les canaux K⁺ (**Peana et Moretti, 2008**).

L' α -terpineol présent dans l'huile essentielle de *S. argel* pourrait également participer à l'effet anti-nociceptif enregistré. Effectivement, des études précédentes ont rapporté l'effet anti-nociceptif de l' α -terpineol sur des modèles de douleur centrale et périphérique, suggérant

des propriétés anti-nociceptives associées à l'inhibition de la libération de la substance P et d'autres molécules inflammatoires telles que la sérotonine, l'histamine, la bradykinine et les prostaglandines (**Quintans-Júnior et al., 2011; Oliveira et al., 2012**), ainsi que l'inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et l'activation du NF- κ B (**Khaleel et al., 2018**).

Par ailleurs, le géraniol autre composant de l'huile essentielle de *S. argel* pourrait contribuer à l'effet anti-nociceptif observé. En effet, une étude récente a mis en évidence l'action anti-nociceptive du géraniol par deux modèles expérimentaux, le test de writhing et le test au formaldéhyde. Le géraniol a entraîné un effet anti-nociceptif significatif lors du test de writhing et au cours de la seconde phase du test au formol, ce qui suggère que son action anti-nociceptive est principalement liée à l'inhibition de la douleur périphérique et de l'inflammation par la libération de divers médiateurs pro-inflammatoires tels que la bradykinine, les prostaglandines et la sérotonine (**La Rocca et al., 2017**).

5. Conclusion

L'évaluation de l'activité antalgique des extraits acétonique, méthanolique, aqueux et de l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* a permis de démontrer leur efficacité sur la douleur centrale et périphérique.

Activité Cicatrisante

Etude de l'activité cicatrisante

L'évaluation de l'efficacité cicatrisante selon le modèle de la plaie par excision sur des rats de trois pommades et une crème préparées, respectivement, à partir des extraits acétonique, méthanolique et aqueux lyophilisé ainsi que l'huile essentielle de *S. argel*.

1. Méthode

1.1. Toxicité cutanée

L'étude de la toxicité cutanée a été réalisée conformément aux lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques OCDE-402 (OCDE, 2017). Un total de 10 rats femelles nullipares saines, non gestantes avec une peau intacte ont été utilisés. Les animaux ont été acclimatés aux conditions du laboratoire pendant cinq jours avant le début de l'étude. La veille du test, 10 % de la surface corporelle a été rasée dans la zone dorsale du tronc des animaux mis à l'essai. Une dose d'essai limite de la formulation à 1 % a été appliquée sur la zone rasée pendant 24 h. Une période d'observation de 14 jours a été entreprise pour déterminer toute manifestation de toxicité cutanée et rapporter les cas de morbidité et de mortalité.

1.2. Formulation des pommades et crème dermiques

Les formules de base de la crème et des pommades préparées dans cette étude sont inspirées du Formulaire Thérapeutique Magistral (FTM, 2010).

La crème à base d'huile essentielle de *S. argel* est une préparation semi-solide de type émulsion hydrophile (H/E). Le protocole utilisé est celui d'une émulsion classique avec la préparation de deux phases (l'une huileuse et l'autre aqueuse) mélangées sous agitation vigoureuse. La composition de la crème de base comprend de l'eau purifiée, l'huile de paraffine, le cremophor® EL et l'alcool cétylique.

Par ailleurs, trois pommades hydrophobes ont été préparées, respectivement, à base des extraits acétonique, méthanolique et aqueux lyophilisé de *S. argel*. La formule de base de ces pommades contient de l'huile de paraffine, de la vaseline et l'alcool cétylique.

1.3. Modèle de la plaie par excision

Le test d'évaluation de l'activité cicatrisante selon le modèle de la plaie par excision circulaire repose sur une étude planimétrique qui permet une évaluation quantitative directe par le calcul de la surface de la plaie et son évolution dans le temps (**Megha Jha et al., 2012**).

Les rats mis en expérimentation ont été répartis en sept groupes de six rats chacun mis à jeun la veille du test. Chaque groupe a été anesthésié par du pentobarbital sodique (50 mg/kg, i.p.) et la région dorsale de chaque rat a été tondue. Une plaie circulaire de 10 mm de diamètre a été délimitée dans la région inter-scapulaire de chaque rat puis excisée à l'aide d'un punch à biopsie. La crème et les pommades à tester, la crème de référence (Madecassol® Bayer) ainsi que les préparations de base (véhicules) ont été appliquées quotidiennement pendant une période de 14 jours.

L'évolution progressive des plaies a été suivie quotidiennement par photographie. De plus, les empreintes des plaies ont été prélevées sur du papier transparent à l'aide d'un feutre indélébile selon le planning suivant : J0, J2, J4, J6, J8, J10, J12 et J14. Sur la base des empreintes prélevées, les surfaces des plaies ont été mesurées à l'aide du logiciel AutoCAD. Les fragments de peau saine de chaque groupe ont été collectés juste après l'excision pour faire l'objet d'un examen histopathologique.

1.4. Contraction de la plaie

La contraction de la plaie représente les changements progressifs de la surface planimétrique de la plaie, à l'exclusion du jour de la réalisation de la plaie. La surface obtenue est ensuite utilisée pour calculer le pourcentage de contraction de la plaie, en portant la taille initiale de la plaie à 100 % en utilisant l'équation suivante (**George et al., 2014**) :

$$\% \text{ contraction plaie} = \frac{\text{Taille initiale de la plaie} - \text{Taille de la plaie à } J_n}{\text{Taille initiale de la plaie}} \times 100$$

1.5. Période d'épithélialisation

La période d'épithélialisation a été calculée comme le nombre de jours requis pour la chute des débris de tissus morts sans aucune plaie brute résiduelle (Nayak *et al.*, 2007).

1.6. Histopathologie

A la fin de la période expérimentale, les fragments de peau de chaque groupe ont été prélevés et conservés dans du formol à 10 % en vue d'une étude anatomopathologique. Une fois fixés, les échantillons ont été déshydratés, éclaircis puis enrobés dans des blocs de paraffine. Des tranches de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées et colorées par les techniques d'hématoxyline-éosine (HE) et de trichrome de Masson (TC).

Les lames ont été observées au microscope optique et l'évaluation de la qualité de la cicatrisation a porté sur la mise en évidence de la prolifération fibroblastique, de la maturation du collagène, de l'angiogenèse et de l'épithélialisation.

2. Résultats

Au cours de l'étude de la toxicité cutanée de la crème et des pommades préparées à partir de l'huile essentielle et des extraits de *S. argel*, aucune manifestation de toxicité ni de cas de morbidité ou de mortalité n'ont été rapportés tout au long de la période expérimentale.

Afin d'étudier les propriétés cicatrisantes de la crème et les pommades préparées à partir de l'huile essentielle et des extraits de *S. argel*, l'évolution des pourcentages de contraction et des moyennes des surfaces des plaies traitées par la crème et les pommades à base de *S. argel*, le produit de référence Madécassol® et leurs contrôles respectifs, durant une période de 14 jours, sont représentés dans le **Tableau 26** et la **Figure 59** sous forme de moyennes arithmétiques $\pm$ les écarts-types.

A J0, aucune différence significative entre les surfaces moyennes des plaies traitées par la crème et les pommades à base de *S. argel*, le standard Madécassol® et leurs contrôles respectifs, n'a été enregistrée ($p=1$) (**Figure 59**).

A J2, une diminution des surfaces moyennes des plaies traitées localement par les pommades à base des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que par la crème à base de l'huile essentielle de *S. argel* a été enregistrée comparativement à leur contrôles respectifs (**Figure 59**), avec des pourcentages de contraction allant de 22,6 à 24,61% ($p < 0,0001$) (**Tableau 26**).

Toutefois, aucune différence n'a été relevée entre la réduction de la surface moyenne des plaies traitées par la crème Madécassol® et celle des groupes contrôle (p=1).

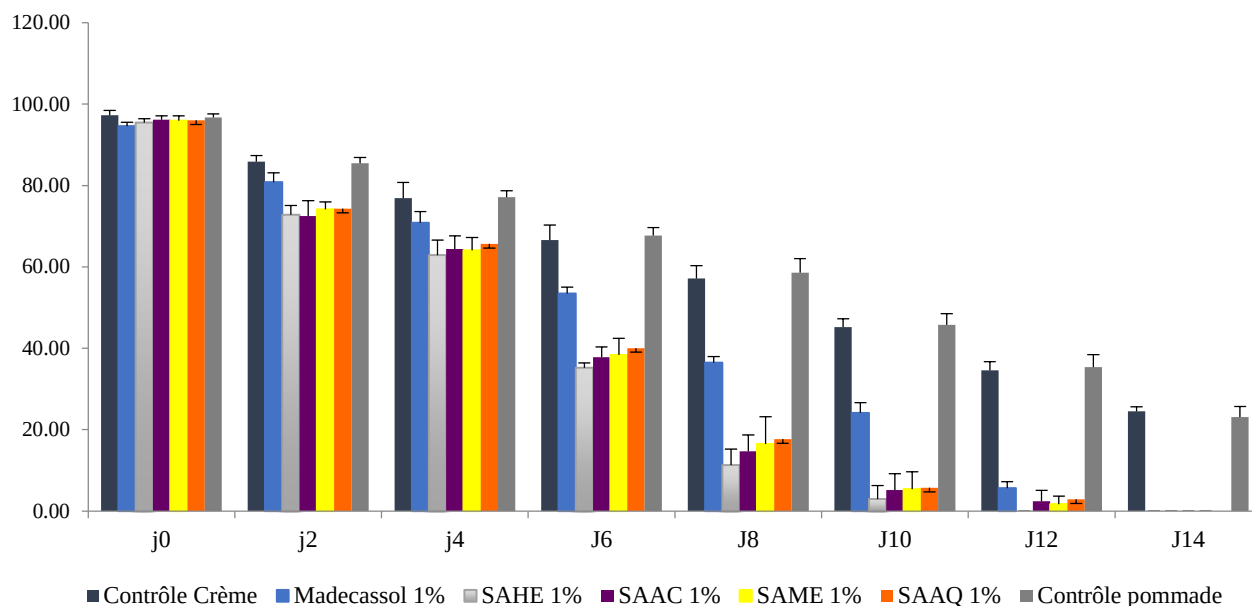


Figure 59 : Evolution des surfaces moyennes des plaies traitées par les pommades et la crème à base d'extraits et d'huile essentielle de *S. argel* en fonction du temps.

A J4, les surfaces moyennes des plaies traitées, respectivement, par la crème à base de l'huile essentielle et les pommades à base des extraits de *S. argel* ont continué à diminuer pour atteindre des taux de contraction allant de 31,66 à 34,1%. Le même constat peut être fait à J6 avec des pourcentages de réduction allant de 58,30 à 63,13% (**Tableau 26, Figure 59**).

A partir de J8, s'amorce une réduction importante de la moyenne des surfaces des plaies traitées localement par la crème préparée à base de l'huile essentielle et des pommades à base des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* avec des pourcentages de réduction de 88,16% ; 84,74% ; 82,88% et 81,66% respectivement (**Tableau 26**), jusqu'à la disparition complète des plaies à compter du onzième jour pour la crème à base d'huile essentielle et du douzième jour pour les pommades à bases des trois extraits de *S. argel*. La surface moyenne des plaies des groupes témoins correspondants persiste au delà du quatorzième jour même si elle diminue progressivement entre le huitième et le douzième jour (**Figure 59**).

Tableau 26 : Pourcentages de contraction et période d'épithélialisation des plaies traitées par les pommades et la crème à base d'extraits et d'huile essentielle de *S. argel*

Groupes	Pourcentage de contraction des plaies (%)							Période d'épithélialisation
	J2	J4	J6	J8	J10	J12	J14	
Contrôle Crème	11,70±2,44 ^a	20,92±4,34 ^a	31,52±4,05 ^a	41,24±3,52 ^a	53,51±2,1 ^a	64,43±2,56 ^a	74,82±1,16 ^a	18,83±0,75 ^a
Contrôle Pommade	11,61±1,36 ^a	20,19±1,36 ^a	29,99±2,16 ^a	39,45±3,53 ^a	52,7±2,65 ^a	63,38±2,93 ^a	76,11±2,31 ^a	18,5±1,37 ^a
Madecassol 1%	14,60±0,02 ^a	25,15±0,02 ^{ac}	43,51±0,01 ^b	61,42±0,01 ^b	74,53±0,02 ^b	94,06±0,01 ^b	100±0,0 ^b	13,50±0,40 ^b
SAHE 1%	23,76±2,72 ^b	34,1±3,57 ^b	63,13±1,09 ^c	88,16±4,05 ^c	96,92±3,45 ^c	100±0,0 ^b	100±0,0 ^b	10,83±0,98 ^c
SAAC 1%	24,61±3,42 ^b	33,04±3,31 ^b	60,69±2,25 ^c	84,74±3,70 ^c	94,67±3,80 ^c	97,5±2,53 ^b	100±0,0 ^b	11,66±1,50 ^{bc}
SAME 1%	22,75±2,03 ^b	33,20±2,79 ^b	60,03±3,64 ^c	82,88±6,26 ^c	94,39±4,04 ^c	98,21±1,85 ^b	100±0,0 ^b	11,66±1,50 ^{bc}
SAAQ 1%	22,60±1,86 ^b	31,66±2,05 ^{bc}	58,30±3,15 ^c	81,66±6,37 ^c	94,07±4,22 ^c	97,03±2,19 ^b	100±0,0 ^b	12±1,54 ^{bc}

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

Par contre, la surface moyenne des plaies traitées par la crème Madécassol® diminue de manière modérée entre le quatrième et le huitième jour pour atteindre une réduction importante le douzième jour mais persiste au delà du treizième jour (**Tableau 26, Figure 59**).

Par ailleurs, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les périodes d'épithélialisation des plaies des groupes contrôle crème et contrôle pommade ($p=0,99$). Les plaies traitées par la crème à base de l'huile essentielle de *S.argel* (SAHE 1%) ont présenté la plus courte période d'épithélialisation, suivies des plaies traitées respectivement par les pommades à base des extraits acétonique (SAAC 1%), méthanolique (SAME 1%) et aqueux (SAAQ 1%) ainsi que celles traitées par le standard Madécassol® (**Tableau 26, Figure 60**).

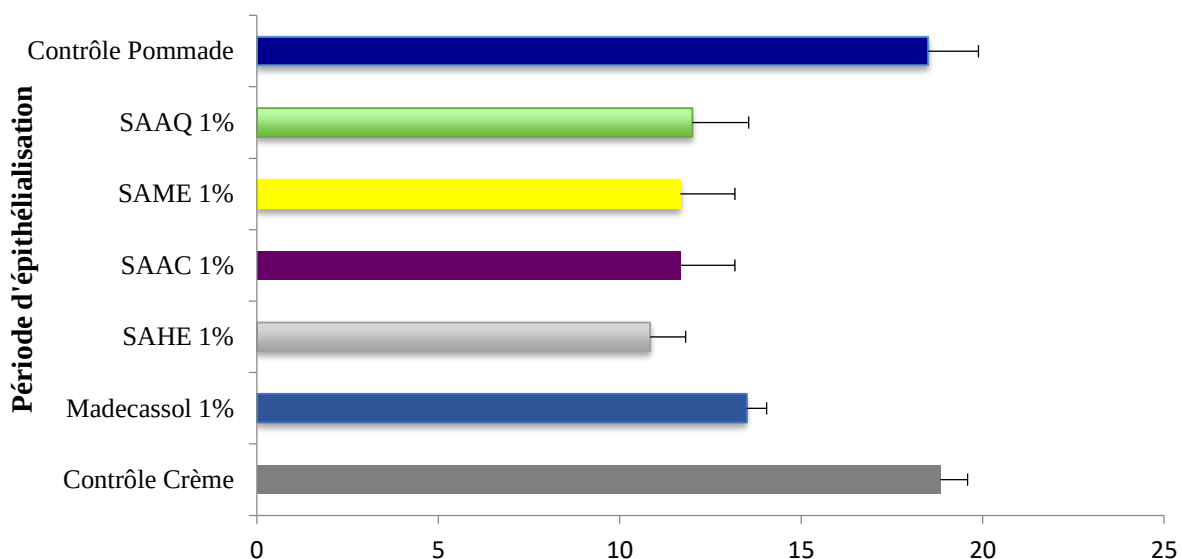


Figure 60 : Représentation graphique de la période d'épithélialisation des plaies traitées par les pommades et la crème à base d'extraits et d'huile essentielle de *S. argel*

Par ailleurs, l'examen histopathologique des plaies traitées respectivement par la crème préparée à base de l'huile essentielle de *S. argel*, ainsi que celles traitées par les pommades à base des extraits acétonique, méthanolique et aqueux, a mis en évidence un revêtement épidermique atrophique avec une zone de cicatrisation dermique riche en fibres de collagène, en fibroblastes matures et en néo-vaisseaux (**Figure 61 B1, B2, D1, D2, E1, E2, F1, F2**). Toutefois, une cicatrisation presque complète avec régénération des annexes pilosébacées a été retrouvée chez les plaies traitées par la crème à base de l'huile essentielle de *S.argel* (**Figure 61 B1**).

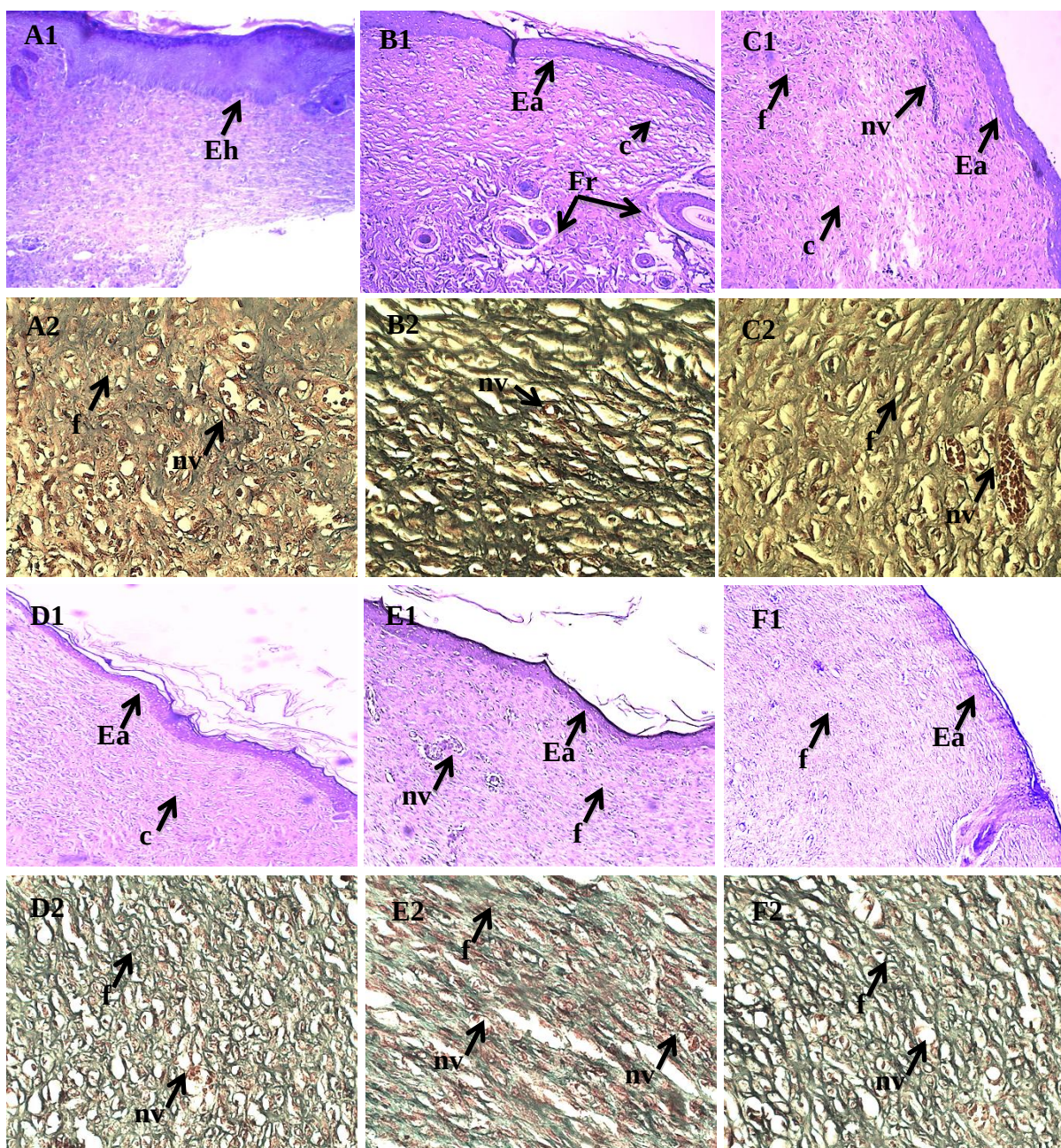


Figure 61 : Micrographies de la peau, coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline / Eosine (1) et Trichrome (2).

(A1) Véhicule x10, (A2) Véhicule x40, (B1) SAHE 1% x10, (B2) SAHE 1% x40, (C1) Madecassol® x10, (C2) Madecassol® x40, (D1) SAAC 1% x10, (D2) SAAC 1% x40, (E1) SAME 1% x10, (E2) SAME 1% x40, (F1) SAAQ 1% x10, (F2) SAAQ 1% x40. **Ea:** Epiderme atrophique, **Eh:** Epiderme hypertrophique, **f:** Fibroblastes, **c:** Fibres de Collagène, **nv:** Néo-vaisseaux, **Fr:** Follicules pileux rudimentaires.

L'examen histopathologique des plaies contrôles, ayant reçues que les véhicules, a montré une cicatrisation retardée par rapport à celle des plaies traitées par la crème à base de l'huile essentielle et celles traitées par les pommades à base d'extrait de *S.argel*, mettant en évidence un épiderme hypertrophique, une prolifération fibroblastique à petites cellules, un dépôt de fibres de collagène ainsi qu'une angiogenèse (**Figure 61 A1, A2**).

De plus, l'examen histopathologique des plaies traitées par le produit de référence Madecassol® a révélé un revêtement épidermique hypertrophique, une prolifération fibroblastique dominante et une néo-vascularisation perpendiculaire à la surface épithéliale (**Figure 61 C1, C2**).

La **Figure 62** représente l'évolution dynamique sous forme de photos des surfaces des plaies témoins, celles traitées par la crème préparée à base de l'huile essentielle de *S. argel*, et par les pommades à base des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que celles ayant reçu le standard Madecassol®.

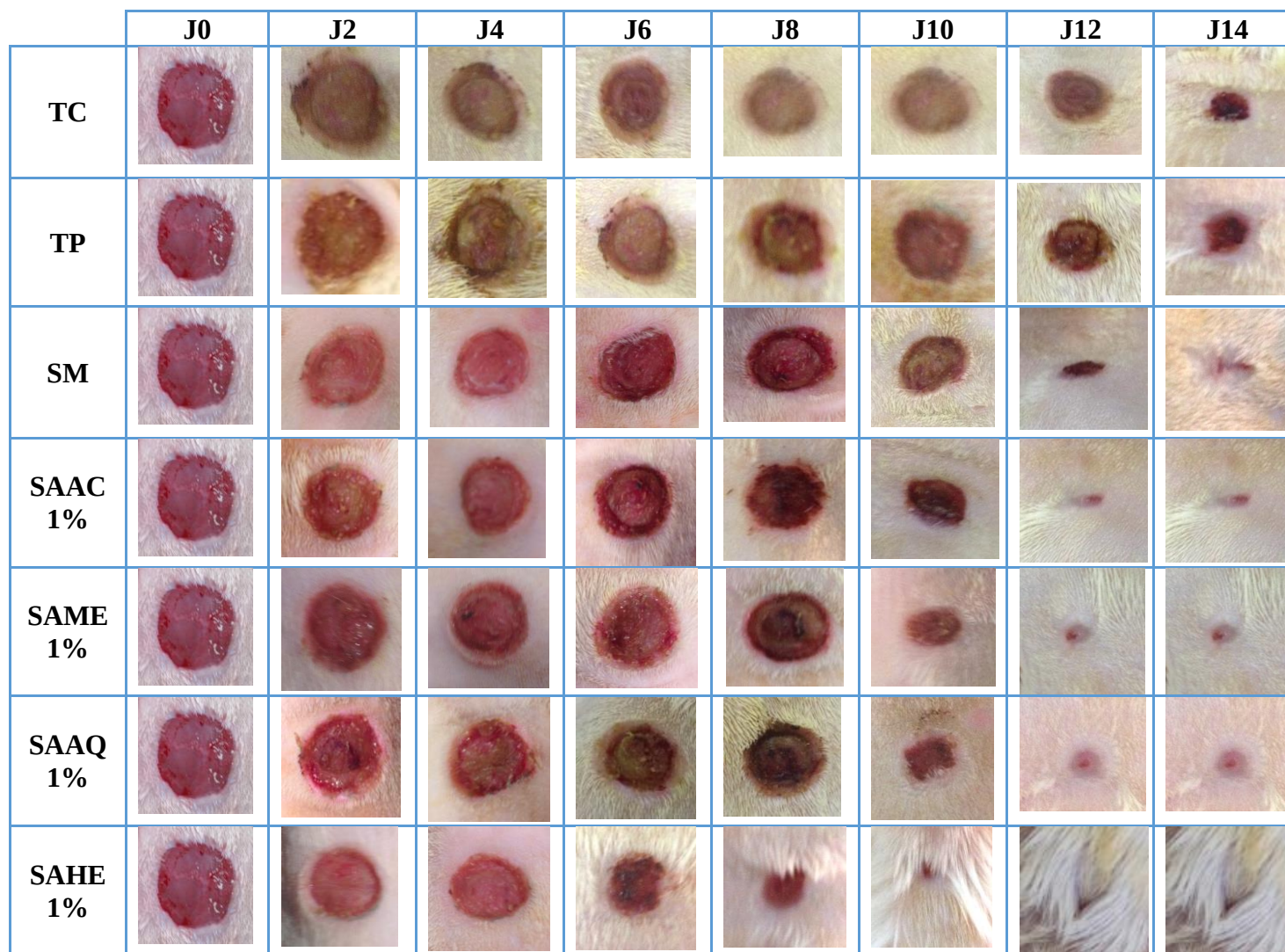


Figure 62 : Evolution en images des surfaces des plaies lors de l'activité cicatrisante de *S. argel*

TC : Témoin Crème, TP : Témoin Pommade, SM : Standard Madécossol®, SAAC 1% : Pommade Extrait Acétonique, SAME 1% : Pommade Extrait Méthanolique, SAAQ 1% : Pommade Extrait Aqueux, SAHE 1% : Crème Huile Essentielle

3. Discussion

La cicatrisation est une réponse naturelle de l'organisme face à une blessure et elle se déroule en trois phases qui se succèdent tout en se chevauchant pour certaines, la phase vasculaire et inflammatoire (caractérisée par l'établissement de l'hémostase et de l'inflammation) ; la phase de prolifération (composée par la granulation, la contraction et l'épithélialisation) et la phase de maturation (formation du tissu cicatriciel) (**Honrado et al., 2005**).

Au cours de cette étude, l'activité cicatrisante des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que celle de l'huile essentielle de *S. argel* a été testée selon le modèle de la plaie par excision. Ce modèle est utilisé pour l'évaluation de la contraction et de l'épithélialisation de la plaie (**Ximenes et al., 2012**). Les résultats obtenus indiquent que le traitement topique des plaies par la crème à base de l'huile essentielle (SAHE 1%) et des pommades à base des extraits acétonique (SAAC 1%), méthanolique (SAME 1%) et aqueux (SAAQ 1%) de *S. argel* a entraîné un effet cicatrisant très significatif, caractérisé par une augmentation des taux de contraction des plaies entre le 4^{ème} et le 8^{ème} jour de traitement et l'écourtement de la période d'épithélialisation comparativement aux véhicules. L'examen histopathologique a confirmé l'effet cicatrisant enregistré en mettant en évidence une bonne épithélialisation riche en fibroblastes et en dépôt de collagène comparativement aux véhicules.

L'effet cicatrisant de l'huile essentielle ainsi que celui des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* pourrait être attribué à leurs propriétés antioxydante, anti-inflammatoire, antalgique et anti-infectieuse.

Les radicaux libres et les produits de réaction oxydative provoquent des lésions tissulaires et sont particulièrement rencontrés lors de la cicatrisation des plaies (**Megha Jha et al., 2012**). La surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraîne un stress oxydatif provoquant une cytotoxicité et un retard de cicatrisation. De ce fait, l'élimination des ROS pourrait être une stratégie importante dans le traitement des plaies (**Shivhare et al., 2010**). Par conséquent, toute substance possédant une activité antioxydante favorise la cicatrisation des plaies et contribue à la régénération de la peau en détruisant les radicaux libres (**Pesin Sutar et al., 2010**).

La richesse des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* en flavonoïdes, notamment la quercitrine, le kaempferol, le kaempferol-3-*O*-rutinoside, l'astragaline et l'argénine, peut contribuer en partie au processus de cicatrisation en inhibant la peroxydation lipidique, prévenant ainsi les lésions tissulaires. En effet, les flavonoïdes et leurs dérivés sont connus pour diminuer la peroxydation lipidique en améliorant la vascularisation et en empêchant ou en ralentissant la progression de la nécrose cellulaire (**George et al., 2014**).

De plus, il convient de noter que l'huile essentielle de *S. argel* se caractérise principalement par une concentration élevée de monoterpènes, en particulier le linalol, l' α -terpineol, le géraniol et le nérol. Le linalol, en particulier, présente des propriétés antioxydantes qui revêtent une importance potentielle dans la prévention de la peroxydation lipidique, comme l'ont suggéré **Peana et Moretti (2008)**.

En outre, il est essentiel de considérer que le processus inflammatoire représente la réaction du système immunitaire face à une infection ou une blessure, bien que son implication ait été établie dans la pathogenèse de diverses maladies et associé à des affections telles que les ulcères et les plaies (**John-Africa et al., 2014**). Au cours des expériences décrites précédemment, les effets anti-inflammatoire et antalgique de l'huile essentielle ainsi que ceux des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* ont été mis en évidence. Ces propriétés antiinflammatoire et antalgique agiraient en réduisant la douleur et l'œdème au niveau des plaies contribuant ainsi au bon déroulement du processus de cicatrisation.

En effet, la présence d'œdème interfère avec le métabolisme des cellules des tissus et diminue le transport d'oxygène, ce qui entraîne des retards de cicatrisation (**Casley-Smith, 1993**). Plusieurs composants présents dans les extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que dans l'huile essentielle de *S. argel* sont à l'origine de leurs propriétés anti-inflammatoire et antalgique (**Se référer aux activités anti-inflammatoire et antalgique pages 130 et 141**).

Enfin, de nombreuses études indiquent que l'activité antimicrobienne est corrélée à la cicatrisation des plaies. L'infection peut sérieusement retarder le processus de cicatrisation en provoquant une formation de tissu de granulation de mauvaise qualité, une réduction de la résistance à la traction du tissu conjonctif et une altération de l'épithélialisation (**Mulisa et al., 2015**). Les flavonoïdes présents dans la composition des trois extraits étudiés pourraient

participer à cet effet. Effectivement, les flavonoïdes sont connus pour améliorer le processus de cicatrisation principalement en raison de leurs propriétés antimicrobiennes et astringentes, ce qui semble être responsable de la contraction de la plaie et l'accroissement de l'épithélialisation (**Tsuchiya et al., 1996**).

L'huile essentielle de *S. argel* présente également des propriétés antimicrobiennes grâce à l'action synergique de plusieurs de ses composants (**voir activité antibactérienne page 120**).

Par ailleurs, l'huile essentielle de *S. argel* a une composition chimique similaire à celle de l'huile essentielle de lavande vraie avec le même composant majeur, le linalol. Par conséquent, la crème d'huile essentielle « SAHE » pourrait avoir le même mécanisme d'action au cours du processus de cicatrisation. L'étude réalisée par **Mori et al (2016)** a mis en évidence l'expression du facteur de croissance TGF- β dans les plaies traitées localement à l'huile essentielle de lavande.

En effet, le TGF- β se caractérise par un large spectre d'action au cours du processus de cicatrisation et est responsable de la stimulation de l'angiogenèse, de l'induction de la prolifération des fibroblastes et de leur transformation en myofibroblastes et de la synthèse du collagène de type I et III (**Mori et al., 2016**).

Une autre étude de Koca Kutlu et al (2013), a étudié l'expression des facteurs de croissance PDGF et EGF au cours du processus de cicatrisation par l'huile essentielle de lavande et a suggéré que le PDGF pourrait provoquer une diminution rapide du tissu de granulation accélérant ainsi la fermeture de la plaie, tandis que l'EGF serait responsable d'une progression de la ré-épithélialisation (**Koca Kutlu et al., 2013**). La confirmation de ces mécanismes d'action pour l'huile essentielle de *S. argel* fera l'objet d'une étude ultérieure.

4. Conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence les propriétés cicatrisantes de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel*, confirmant ainsi son utilisation traditionnelle pour le traitement des plaies.

Activité Antiulcéreuse

Activité antiulcéreuse

L'évaluation de l'activité antiulcéreuse des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que de l'huile essentielle de *S. argel* s'est faite selon deux modèles expérimentaux : l'ulcère induit par l'aspirine et l'ulcère induit par ligature du pyllore.

1. Ulcère induit par l'aspirine

1.1. Méthode

Le test de l'ulcère induit par l'aspirine a pour but d'évaluer l'effet gastro-protecteur des substances testées (**Hegde et al., 1996**).

Au cours de cette expérience, des rats albinos pesant entre 150 et 200 g ont été répartis en six groupes de 6 rats chacun. Le premier groupe a servi de contrôle et a reçu de l'eau physiologique (10 ml / kg), le deuxième groupe a servi de standard et a reçu de la ranitidine (50 mg / kg) et les groupes restant ont servi de test et ont été traités respectivement avec les extraits acétonique (SAAC 250 mg/kg), méthanolique (SAME 250 mg/kg), aqueux (SAAQ 250 mg/kg) et l'huile essentielle (SAHE 250 mg/kg). Les animaux ont été traités quotidiennement pendant huit jours. Le neuvième jour, les rats ont été mis à jeun pendant 24h puis l'ulcère a été induit par administration orale d'une suspension aqueuse d'aspirine à raison de 200 mg/kg. Quatre heures plus tard, les animaux ont été sacrifiés et leurs estomacs ont été ouverts pour calculer l'indice d'ulcère U_I par la méthode de Kunchandy (**Kunchandy et al., 1985**).

$$U_I = U_N + U_S + (U_P \times 10^{-1})$$

U_I = Ulcère index

U_N = Moyenne du nombre d'ulcère par animal

U_S = Moyenne de l'ulcère score

U_P = Pourcentage des animaux ayant des ulcères

Les estomacs ont été récupérés pour faire l'objet d'une étude anatomopathologique, afin d'être examinés microscopiquement pour mettre en évidence des changements pathomorphologiques tels que la congestion, l'œdème, l'hémorragie et l'érosion.

1.2. Résultats

Les résultats du test de l'ulcère induit par l'aspirine sont présentés dans le **Tableau 27**. Les extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que l'huile essentielle de *S. argel* ont présenté un effet gastro-protectif significatif sur l'ulcération induite par l'aspirine chez le rat. L'administration orale de SAAC, SAME, SAAQ et SAHE à la dose de 250 mg/kg a entraîné une réduction significative de l'indice d'ulcère, par rapport au groupe témoin ($p < 0,0001$), avec des pourcentages de protection contre l'ulcère de 84,71, 66,92, 78,89 et 84,71%, respectivement. De plus, le produit de référence « ranitidine » (50 mg/kg) a entraîné un effet gastro-protecteur significatif (68,8% d'inhibition) comparable à celui des extraits et de l'huile essentielle à la dose de 250 mg/kg.

Tableau 27 : Effets des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) ainsi que de l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de *S. argel* sur l'ulcère gastrique induit par l'aspirine chez le rat

Groupes	Dose (mg/kg)	Ulcère index	% protection
Contrôle	(10 mg/kg p.c.)	7,26±1,44 ^a	–
Standard Ranitidine	50	2,24±0,66 ^b	68,8
SAAC	250	1,18±0,66 ^b	84,71
SAME	250	2,41±0,61 ^b	66,92
SAAQ	250	1,55±0,66 ^b	78,89
SAHE	250	1,03±0,66 ^b	84,71

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

L'examen histopathologique des estomacs des rats mis en expérimentation a révélé la présence d'ulcérations dans le groupe témoin non traité (**Figure 63 (A2)**), contrairement aux groupes traités par SAAC, SAHE et ranitidine pour lesquels aucune lésion n'a été mise en évidence (**Figure 63 (B2), (C2), (D2)**). D'autre part, de rares lésions de desquamation cellulaire ont été enregistrées chez le groupe traité par l'extrait méthanolique, alors que, des lésions d'exulcération superficielle en nombre réduit ont été mises en évidence chez le groupe traité à l'extrait aqueux (**Figure 63 (E2), (F2)**). Ces résultats confirment l'effet gastro-protecteur enregistré.

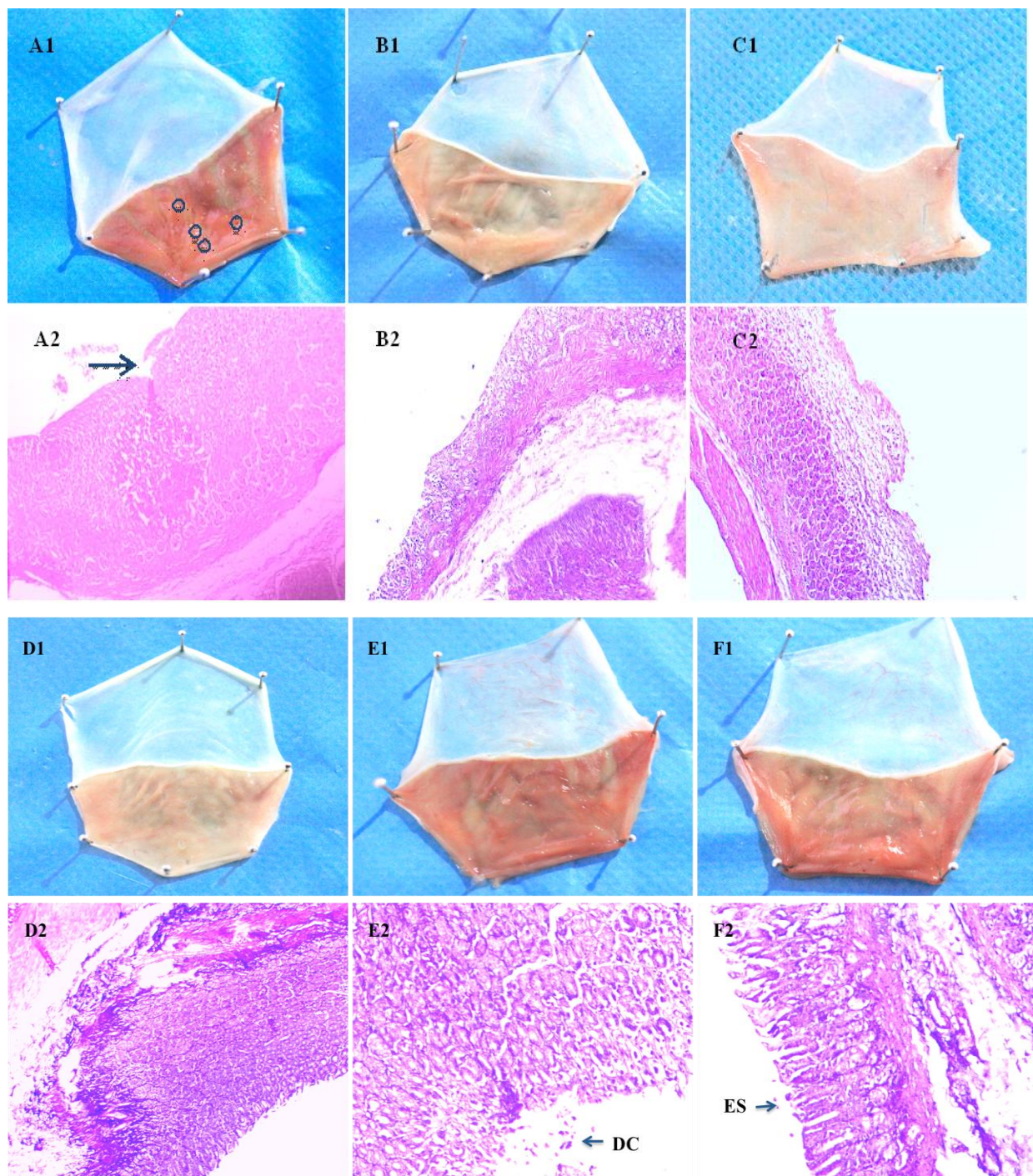


Figure 63 : Photographies (1) et micrographies (2) de l'estomac lors du test de l'ulcère gastrique induit par l'aspirine chez le rat, coupes histologiques colorées à l'hématoxyline/éosine.

(A1) Contrôle, (A2) Contrôle x10, (B1) Ranitidine 50 mg/kg, (B2) Ranitidine 50 mg/kg x4, (C1) SAHE 250 mg/kg, (C2) SAHE 250 mg/kg x4, (D1) SAAC 250 mg/kg, (D2) SAAC 250 mg/kg x10, (E1) SAME 250 mg/kg, (E2) SAME 250 mg/kg x10, (F1) SAAQ 250 mg/kg, (F2) SAAQ 250 mg/kg x4. DC: Desquamation cellulaire, ES: Exulcération superficielle. Les cercles et la flèche noire indiquent la présence d'ulcère.

2. Ulcère par ligature du pylore

2.1. Méthode

Le test de l'ulcère induit par ligature du pylore a été réalisé selon la méthode décrite par **Shay et al., (1945)**. Le principe de ce test est d'évaluer l'effet anti-sécrétoire des substances testées. Les animaux ont été mis à jeun pendant 24 heures. Six groupes de 6 rats ont été traités respectivement avec les extraits acétonique (SAAC 250 mg/kg), méthanolique (SAME 250 mg/kg), aqueux (SAAQ 250 mg/kg) et l'huile essentielle (SAHE 250 mg/kg), la ranitidine (50 mg / kg) et de l'eau physiologique (10 ml / kg) 30 minutes avant la ligature pylorique. Après la période de jeun, les rats ont été anesthésiés et l'abdomen a été ouvert par une incision médiane sous l'apophyse xiphoïde et l'extrémité pylorique a été ligaturée. La ligature a été réalisée sans endommager l'approvisionnement en sang de l'estomac. Les rats ont été privés de nourriture et d'eau pendant la période postopératoire. Quatre heures après la chirurgie, tous les animaux ont été sacrifiés. Les estomacs ont été ouverts et le contenu gastrique a été recueilli. Le volume du contenu gastrique a été mesuré puis centrifugé à 1000 g pendant 10 min. L'acidité partielle et l'acidité totale ont été estimées en titrant 1ml de surnageant avec du NaOH 0,01 N, en utilisant la phénolphthaléine comme indicateur coloré. L'acidité a été exprimée comme suit :

$$\text{Acidité} = \frac{\text{Volume de NaOH} \times \text{Normalité} \times 100}{0.1} \text{ mEq l}^{-1}$$

L'indice d'ulcère a été estimé par la méthode de Kunchandy (**Kunchandy et al., 1985**). Les estomacs ont été récupérés pour faire l'objet d'une étude anatomopathologique, afin d'être examinés macroscopiquement pour mettre en évidence des changements pathomorphologiques tels que congestion, œdème, hémorragie et érosion.

2.2. Résultats

Les résultats de l'effet gastro-protecteur de l'huile essentielle (SAHE) et des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) de *S. argel* sur l'ulcère gastrique induit par la ligature du pylore chez le rat sont présentés dans le **Tableau 28**. L'administration orale de SAHE ainsi que celle de SAAC, SAME et SAAQ à la dose de 250 mg/kg ont significativement atténué le volume gastrique, l'acidité libre, l'acidité totale et l'indice d'ulcère ($p < 0,0001$), en considérant le groupe témoin, avec des pourcentages de

protection contre l'ulcère de 77,65% ;81,44% ; 78,53% et 59,11%, respectivement. De plus, leur effet antiulcéreux à la dose de 250 mg/kg est comparable à celui du produit standard ranitidine à la dose de 50 mg/kg, avec un taux de protection contre l'ulcère de 79,16 %.

Tableau 28 : Effets des extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) ainsi que de l'huile essentielle (SAHE) des feuilles de *S. argel* sur l'ulcère gastrique induit par ligature du pyllore chez le rat

Groupe	Dose (mg/kg)	Volume jus gastrique (mL)	Acidité Partielle (mEq/L)	Acidité Totale (mEq/L)	Ulcère index	% protection
Contrôle	(10 mg/kg p.c.)	6,5±1,16 ^a	58,33±3,22	75,43±3,37	6,93±1,16 ^a	-
Ranitidine	50	2,13±0,46 ^b	12,58±0,54	28,61±1,37	1,48±0,94 ^b	79,16
SAAC	250	2,08±0,41	12,43±2,63	28,38±1,25	1,28±0,75	81,44
SAME	250	2,2±0,13	12,96±1,3	28,93±2,63	1,46±0,48	78,53
SAAQ	250	3,11±0,28	12,48±1,31	40,2±3,13	2,89±1,3	59,11
SAHE	250	2,28±0,15 ^b	12,98±0,88	28,98±0,91	1,59±1,13 ^b	77,65

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

L'examen histologique des estomacs a révélé l'absence de lésions dans les groupes traités, respectivement, par le standard ranitidine, l'huile essentielle et l'extrait acétonique de *S. argel* (**Figure 64 (B2), (C2), (D2)**) contrairement au groupe témoin pour lequel des lésions d'ulcération ont été rapportées (**Figure 64 (A2)**). Par ailleurs, de rares et minimales lésions d'exulcération ont été enregistrées chez certains rats traités par les extraits méthanolique et aqueux (**Figure 64 (E2), (F2)**). Ces résultats corroborent avec ceux rapportés dans le **Tableau 28**.

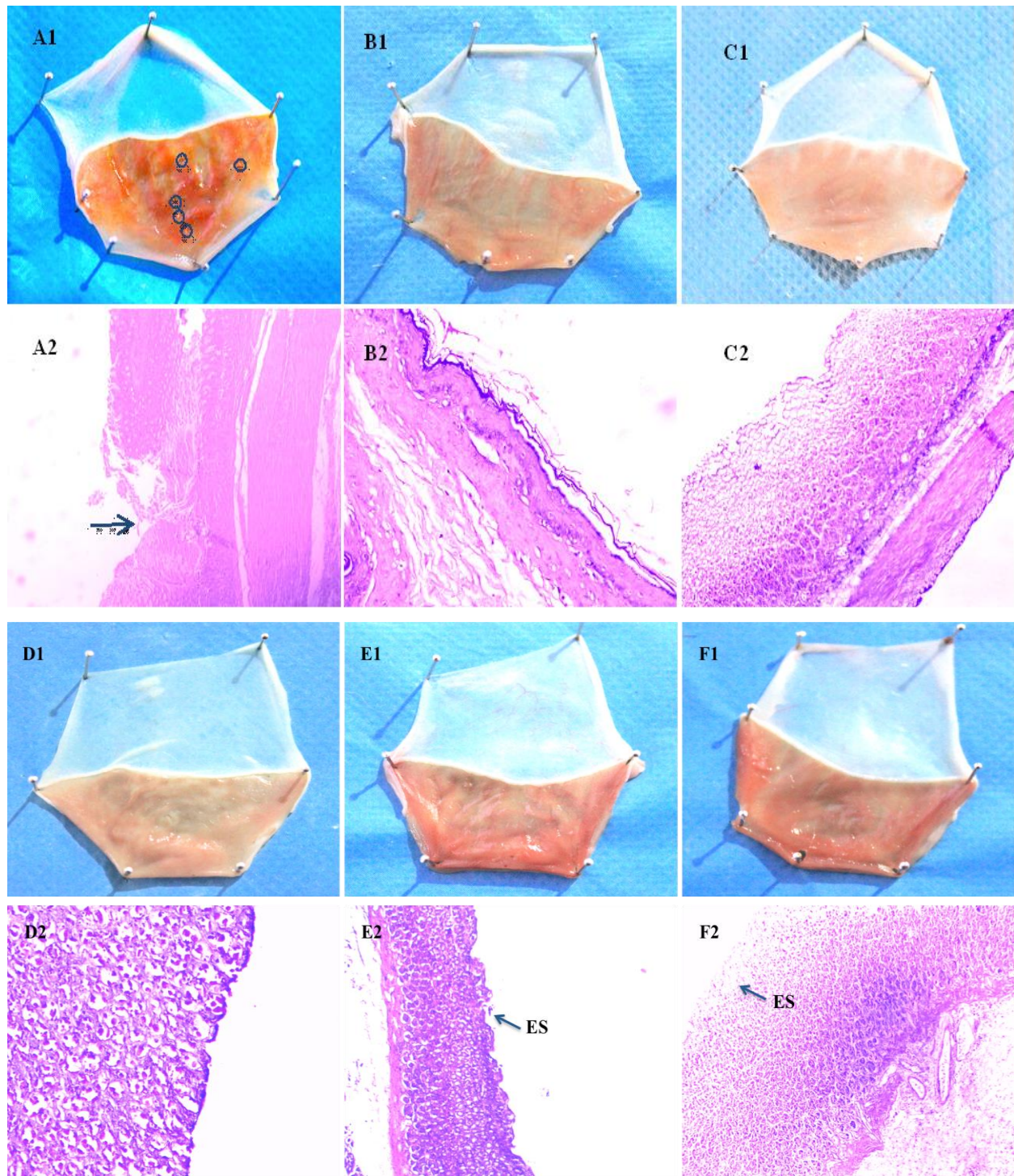


Figure 64 : Photographies (1) et micrographies (2) de l'estomac lors du test de ligature du pylore chez le rat, coupes histologiques colorées à l'hématoxyline/éosine.

(A1) Contrôle, (A2) Contrôle x10, (B1) Ranitidine 50 mg/kg, (B2) Ranitidine 50 mg/kg x4, (C1) SAHE 250 mg/kg, (C2) SAHE 250 mg/kg x4, (D1) SAAC 250 mg/kg, (D2) SAAC 250 mg/kg x10, (E1) SAME 250 mg/kg, (E2) SAME 250 mg/kg x4, (F1) SAAQ 250 mg/kg, (F2) SAAQ 250 mg/kg x10. **DC** : Desquamation cellulaire, **ES**: Exulcération superficielle. Les cercles et la flèche noire indiquent la présence d'ulcère.

Les résultats de nos travaux ont été consignés au sein d'un article original intitulé :

"Wound healing and antiulcer activities of *Solenostemma oleifolium* (Nectoux) Bullock & E.A. Bruce ex Maire essential oil in rats" dans la revue Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research , en 2024.

3. Discussion

L'ulcère peptique est l'une des maladies gastro-intestinales les plus répandues. En règle générale, les ulcères gastriques résultent d'un déséquilibre entre les facteurs agressifs et le maintien de l'intégrité de la muqueuse par des mécanismes de défense endogènes (**Rajkapoor et al., 2002 ; Ahmed et al., 2016**).

L'étude de l'activité antiulcéreuse des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que celle de l'huile essentielle de *S. argel* a été réalisée selon les modèles de l'ulcère induit par l'aspirine et de l'ulcère induit par la ligature du pylore.

L'ulcération gastrique est une limitation majeure à l'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (**Maruthappan et al., 2010**). Les AINS synthétiques comme l'aspirine causent des dommages aux muqueuses en interférant avec la synthèse des prostaglandines, en augmentant la sécrétion acide, l'infiltration des neutrophiles, les changements dans la production d'oxyde nitrique (NO), la génération de ROS, l'initiation de la peroxydation lipidique et une baisse de la production de mucus, entraînant ainsi des ulcères hémorragiques (**Rozza et al., 2011**).

Dans la présente étude, l'huile essentielle (SAHE) ainsi que les extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) des feuilles de *S.argel* ont montré un effet gastroprotecteur significatif contre l'ulcère induit par l'aspirine. Ces résultats indiquent que SAHE, SAAC, SAME et SAAQ présentent un effet cytoprotecteur efficace, en agissant probablement par augmentation de la sécrétion de mucus et/ou de bicarbonate, ce qui inhibe la formation de lésions ulcéreuses.

Par ailleurs, le modèle de l'ulcère induit par la ligature du pylore a été utilisé pour étudier l'effet de l'huile essentielle et des extraits de *S. argel* sur la sécrétion gastrique.

Dans la méthode de la ligature pylorique, l'autodigestion de la muqueuse gastrique par l'accumulation de sucs gastriques, l'interférence dans le flux sanguin gastrique et la rupture de la barrière de la muqueuse gastrique sont responsables de l'induction d'ulcérations (**Govindarajan et al., 2006 ; Galdas et al., 2011 ; Afroza Bashir et al., 2014**). Dans cette étude, l'huile essentielle (SAHE) ainsi que les extraits acétonique (SAAC), méthanolique

(SAME) et aqueux (SAAQ) des feuilles de *S. argel*, ont significativement diminué le volume gastrique, l'acidité libre, l'acidité totale et l'indice d'ulcère empêchant ainsi la formation d'ulcère, ces résultats suggèrent leur activité anti-sécrétoire.

Les extraits de plantes sont parmi les sources les plus intéressantes pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques en particulier dans le traitement des ulcères gastriques (**Sannomiya et al., 2005**). Dans la présente étude, les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* ont présenté un excellent effet gastroprotecteur. Ce dernier pourrait être lié à leur richesse en flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes sont parmi les composants cytoprotecteurs pour lesquels l'efficacité anti-ulcérogène a été largement confirmée (**Sumbul et al., 2011**). Ils protègent la muqueuse gastrique contre une variété d'agents ulcérogènes via plusieurs mécanismes d'action, principalement leurs propriétés anti-radicalaires et antioxydantes, une production accrue de mucus, une action antisécrétoire et une inhibition de la croissance d'*Helicobacter pylori* (**Di Carlo et al., 1999**).

Parmi les flavonoïdes présents dans la composition des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel*, la rutine pourrait participer à l'effet gastroprotecteur observé. L'effet cytoprotecteur de ce flavonoïde semble être médié par le facteur d'activation plaquettaire (PAF) endogène, car il inhibe de manière dose-dépendante le contenu muqueux du PAF. Un autre mécanisme possible serait lié aux propriétés antioxydantes de la rutine, qui agirait en réduisant les taux de lipoperoxydes et en augmentant l'activité de l'enzyme antioxydante glutathion peroxydase (GSH -Px) (**Kelly et al., 2009**). Effectivement, l'étude menée par **Abdel-Raheem et al., (2010)** a permis de mettre en évidence l'activité gastroprotectrice de la rutine contre des lésions gastriques induites par l'indométacine chez le rat, par l'inhibition de l'infiltration des neutrophiles et la suppression de la génération du stress oxydatif (augmentation du GSH et de la SOD et réduction de la MPO) (**Abdel-Raheem et al., 2010**).

De plus, la quercétine présente dans la composition des trois extraits de *S. argel* pourrait également contribuer à l'effet gastroprotecteur enregistré. En effet, ce flavonoïde protégerait la muqueuse gastro-intestinale des lésions aiguës induites par divers modèles expérimentaux notamment les ulcères induits par ligature du pylore, la réserpine, l'aspirine, l'indométacine et l'éthanol (**Kelly et al., 2009**). Son mécanisme d'action gastroprotecteur impliquerait le PAF endogène (**Izzo et al., 1994**), une augmentation de la production de mucus, des propriétés antihistaminiques, qui diminuent les taux d'histamine (**Alarcon et al., 1994**). Toutefois, le principal mécanisme d'action de l'effet gastroprotecteur de ce flavonol reste ses propriétés

antioxydantes, par l'inhibition de la peroxydation lipidique, l'augmentation des niveaux de composés SH non protéiques muqueux (agents antioxydants importants) dans le GSH-Px **(Martin et al., 1998)** et les activités de superoxyde dismutase, ainsi que la réduction des composés carbonylés protéiques **(Kahraman et al., 2003)**.

Enfin, la présence du Kaempferol dans les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* peut également contribuer à l'effet gastroprotecteur observé. Ce flavonol agirait en inhibant l'accumulation de neutrophiles et en diminuant l'activité de la myéloperoxydase (MPO) et les niveaux de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'interleukine-6 (IL-6), améliorant ainsi les niveaux d'acide nitrique et du mucus gastrique **(Serafim et al., 2020)**.

Par ailleurs, il a été démontré que certains monoterpènes présents dans les huiles essentielles d'origine végétale ont des effets gastroprotecteurs contre différents agents ulcérogènes **(De Carvalho et al., 2013)**. L'huile essentielle de *S. argel* est majoritairement composée de monoterpènes. Son activité gastroprotectrice ne peut être associée à l'action d'un composé chimique spécifique, mais probablement à un effet synergique de différents composants de l'huile tels que le linalol, le géraniol, le nérol, l' α -terpinéol et le limonène.

L'effet gastroprotecteur de SAHE peut être attribué en partie à son composé majoritaire, le linalol. En effet, les effets antioxydants et anti-inflammatoires du linalol décrits dans la littérature permettraient de prévenir les dommages gastriques causés par les agents ulcérogènes. L'étude menée par **Da Silva et al., (2016)**, a rapporté que l'activité gastroprotectrice du linalol, est probablement liée à l'augmentation de l'activité antioxydante. En effet, le linalol a pu réduire de manière significative la peroxydation lipidique, ce qui suggère qu'il agit comme piègeur des espèces réactives de l'oxygène **(Da Silva et al., 2016)**.

La présence de géraniol dans la composition de SAHE peut également participer à son effet gastroprotecteur. En effet, le géraniol augmente la libération de facteurs antioxydants, et entretient les taux de PGE₂ et de NO, qui agissent dans le maintien de la microcirculation gastrique **(De Carvalho et al., 2013 ; Périgo et al., 2020)**. Le géraniol active également les récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique A (GABA-A) et du TRPV-1, augmentant ainsi la libération de CGRP qui agit en relaxant le muscle lisse entourant les artérioles, entraînant une augmentation du flux sanguin muqueux, une augmentation de la production de mucus et du pH intracellulaire à la surface de l'estomac **(De Carvalho et al., 2013; Périgo et al., 2020)**. De même, des résultats antérieurs apportent la preuve d'un effet bénéfique du nérol après

induction de l'ulcère gastrique, impliquant une protection contre les dommages gastriques et une modulation du système immunologique, suggérant le potentiel gastroprotecteur de ce monoterpène (**González-Ramírez et al., 2016**).

De plus, l' α -terpinéol présent dans SAHE peut également contribuer à l'effet gastroprotecteur observé. En effet, l'étude de **Souza et al., (2011)** a démontré une action gastroprotectrice substantielle contre les AINS dans des modèles expérimentaux *in vivo* (**Souza et al., 2011**). Les effets gastroprotecteurs observés de l' α -terpinéol impliquent probablement la participation de mécanismes cytoprotecteurs (**Souza et al., 2011 ; Oliveira et al., 2012, Khaleel et al., 2018**).

Enfin, le limonène présent dans SAHE peut également participer à annuler l'effet secondaire des AINS et ainsi prévenir la formation d'ulcères gastriques par renforcement de la résistance de la barrière muqueuse par un revêtement protecteur (**Rozza et al., 2011**).

Par ailleurs, SAHE a enregistré un effet antisécrétoire remarquable en diminuant le volume gastrique et l'acidité de l'estomac. Selon la littérature, les composants monoterpéniques cités ci-dessus n'auraient pas d'effet anti-sécrétoire (**Assis Oliveira et al., 2014**), par conséquent, l'activité anti-sécrétoire enregistrée pourrait être secondaire à la cicatrisation de l'ulcère. En effet, l'étude réalisée précédemment sur l'ulcère gastrique chez le rat a démontré l'effet anti-sécrétoire du géraniol secondaire à la cicatrisation de l'ulcère ou à un effet sur l'autorégulation de la libération de gastrine (**Bhattamisra et al., 2018**).

Cependant, le terpinène-4-ol présent dans l'HESA pourrait participer à l'effet anti-sécrétoire. En effet, l'étude menée par **Matsunaga et al., (2000)** a mis en évidence l'effet anti-sécrétoire du terpinène-4-ol présent dans l'huile essentielle de *Cryptomeria japonica* lors d'ulcères induits par plusieurs médiateurs.

4. Conclusion

La présente étude a permis de confirmer l'effet gastroprotecteur de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel*

Activité Antidiabétique

Etude des activités antidiabétique et neuroprotectrice

1. Méthode

1.1. Induction du diabète et modèle expérimental

L'alloxane est une β -cytotoxine utilisée dans la recherche sur le diabète pour induire un diabète de type I. Elle entraîne une nécrose des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (**Mourya et al., 2016**). L'Alloxane a une action diabétogénique lorsqu'il est administré par voie parentérale chez les rongeurs.

Au cours de cette étude, le diabète a été induit par une injection intra-péritonéale d'Alloxane monohydrate dilué dans de l'eau physiologique à une dose de 150 mg / kg de poids corporel chez des rats à jeun. Une heure après l'administration de l'Alloxane, les animaux ont été nourris avec des granulés et de l'eau *ad libitum*. Au bout de 48 heures, des prélèvements sanguins ont été réalisés au niveau de l'espace rétro-orbitale et le taux de glycémie dans le sang a été déterminé à l'aide d'un glucomètre. Les animaux présentant une glycémie supérieure à 200 mg/dl ont été considérés comme hyperglycémiques et sélectionnés pour l'étude (**Nawale et al., 2016**). Par la suite, les rats ont été divisés en 6 groupes de 6 rats chacun suivant le schéma expérimental représenté dans la **Figure 63**.

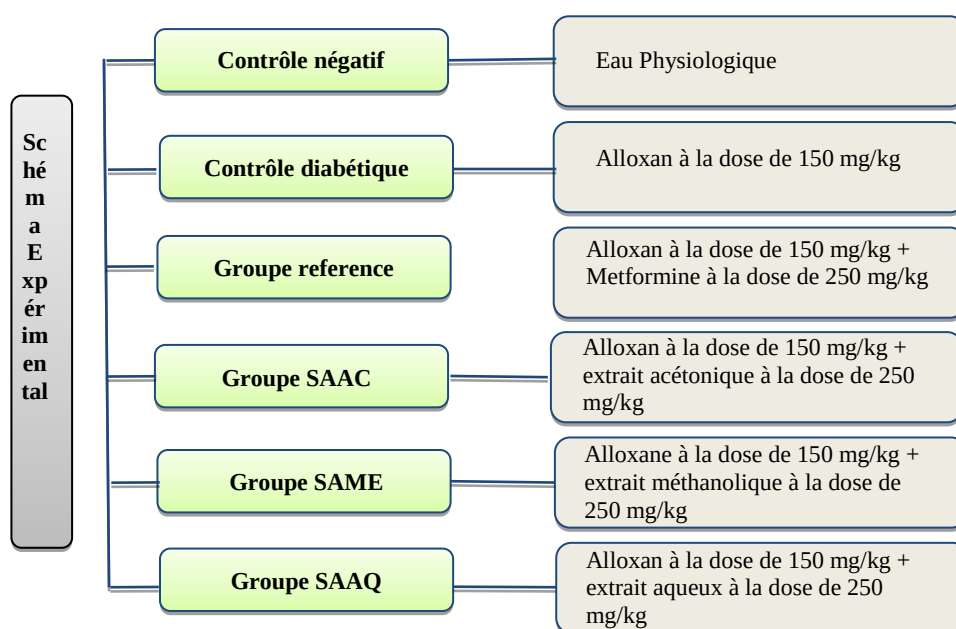


Figure 63 : Schéma expérimental de l'activité antidiabétique des extraits de *S. argel* selon le modèle du diabète induit chez les rats par l'Alloxane

Soixante-douze heures (72 h) après l'induction du diabète, les extraits à tester et le produit de référence ont été administrés quotidiennement pendant 28 jours par voie orale. Les effets des extraits sur les rats normaux et diabétiques ont été observés en enregistrant les modifications du poids corporel tout au long de la période expérimentale.

1.2. Paramètres biochimiques

Des prélèvements de sang ont été recueillis le 7^{ème}, le 14^{ème}, le 21^{ème} et le 28^{ème} jour à compter du début de l'étude pour la mesure du taux de glycémie (Kit SPINREACT).

Par ailleurs, les paramètres biochimiques suivants cholestérol total, triglycérides, alanine aminotransférase (ALAT), aspartate aminotransférase (AST), ASAT phosphatase alcaline (PAL), urée et créatinine ont été déterminés au 28^{ème} jour afin d'évaluer le profil lipidique et les fonctions hépatique et rénale (Kits SPINREACT).

1.3. Etude anatomopathologique

Au terme de la période expérimentale, les animaux ont été autopsiés et les organes suivants, foie, reins et pancréas ont été prélevés et conservés dans du formol à 10% afin de faire l'objet d'une étude anatomopathologique. Par la suite, les organes prélevés ont suivi les étapes classiques de déshydratation, d'enrobage, de coupe et de coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. Les lames ont été observées au microscope optique (Leica DMLS2.11501200, Caméra Leica MC170HD).

1.4. Evaluation de l'effet neuroprotecteur

1.4.1. Examen histopathologique

Afin d'évaluer l'effet neuroprotecteur des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* au cours du diabète induit par l'Alloxane, les cerveaux des rats mis en expérimentation ont été prélevés et stockés dans du formol à 10 %. Une fois fixés, ils ont été déshydratés, enrobés dans la paraffine pour former des blocs puis coupés au microtome en sections fines de 4 µm. Les cerveaux ont été, par la suite, colorés avec de l'hématoxyline et de l'éosine ainsi que par du violet de crésyl. La lecture et la prise de photos ont été faites au microscope optique (Leica DMLS2.11501200, Caméra Leica MC170HD).

Les résultats histopathologiques ont été évalués au microscope optique selon le barème suivant : absence (0), faible (1), modérée (2), sévère (3) de dégénérescence neuronale, d'apoptose, de gliose, d'œdème et d'hémorragie (**Güven et al., 2009**).

1.4.2. Immunohistochimie

Afin de réaliser la technique d'immunohistochimie, les blocs des cerveaux obtenus auparavant, ont été coupés en sections de 4 µm d'épaisseur et montées sur des lames porte-objet adhérentes Polysine (Epredia™, UK). Après déparaffinage des lames à l'aide du PT Module (Epredia™, UK), une coloration indirecte a été appliquée, en utilisant la méthode streptavidine – biotine – peroxydase pour l'anticorps HSP-70-HSP1A (Anticorps à reconstituer, Monoclonal Mouse IgG_{2A}, R&D Systems Biotechne Brand, USA).

Les lames ont été traitées avec du peroxyde d'hydrogène à 3% et du méthanol pendant 30 minutes pour bloquer l'activité de la peroxydase endogène suivi d'un rinçage dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (pH = 7,4). Les lames ont été, par la suite, incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire HSP-70 à la concentration de 20 µg/ml. Après un lavage minutieux avec du PBS (3 x 5 min), les lames ont été inondées avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 5 %, rincées avec du PBS (2 x 5 min) et incubées avec l'anticorps secondaire Envision Flex/HRP anti-mouse (15 min) (Dako, USA). Puis, les coupes ont été rincées avec du PBS (2 x 5 min) et incubées avec un complexe avidine – biotine – peroxydase (15 min) (Dako, USA). Après rinçage au PBS (2 x 5 min), les coupes ont été incubées avec une solution de substrat chromogène de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Chromogen Envision FlexDako, USA) pendant 10 min. Après rinçage à l'eau distillée, les coupes ont été contre-colorées avec de l'hématoxyline. Par la suite, les lames ont été déshydratées dans des bacs d'alcool éthylique absolu (3 x 2 min), puis nettoyées au xylène (trois bacs successifs) et montées à l'aide d'un dispositif de collage.

Les lames ont été observées au microscope optique (Leica DMLS2.11501200, Caméra Leica MC170HD) et l'intensité de la coloration par l'HSP-70 a été notée comme absente (0), faible (1), modérée (2) ou forte (3) (**Güven et al., 2009**) :

-  Forte coloration sombre, facilement visible avec un objectif de faible puissance et impliquant > 50 % des cellules.
-  Zones de coloration focale sombre modérée (<50 % des cellules) ou coloration modérée de >50 % des cellules.
-  Faible coloration focale modérée dans <50 % des cellules, ou coloration pâle dans n'importe quelle proportion de cellules difficilement visibles à faible puissance.

2. Résultats

2.1. Suivi des poids

Tout au long de la période expérimentale, un suivi hebdomadaire des poids corporels des rats mis à l'essai a été réalisé. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 64**.

Les rats mis à l'essai ont présenté un gain en poids progressif tout au long de la période expérimentale hormis les rats appartenant au groupe traité par l'extrait acétonique (SAAC) qui eux, ont conservé le même poids durant tout l'essai.

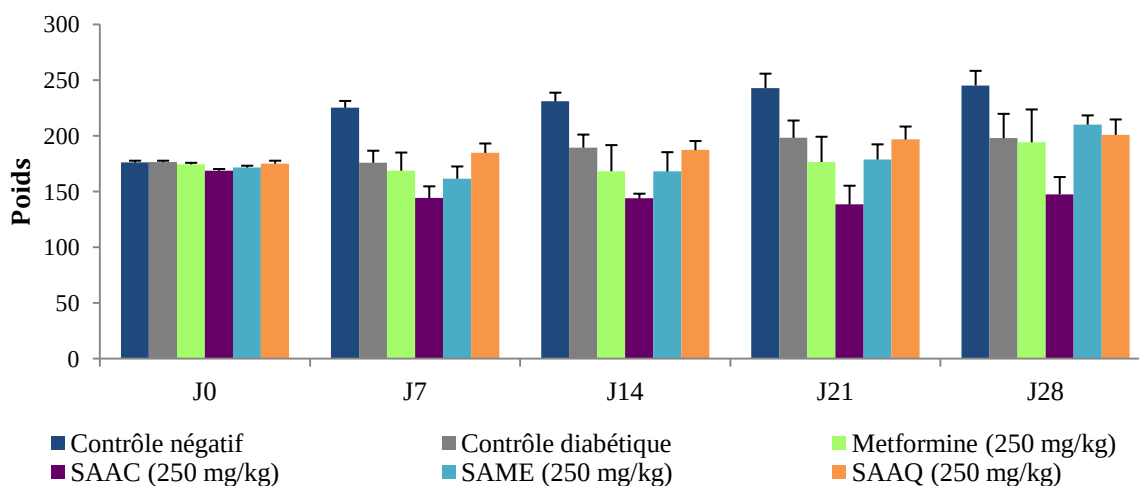


Figure 64 : Suivi hebdomadaire des poids des rats au cours de l'activité antidiabétique des extraits de *S. argel*

2.2. Effet sur la glycémie

Les extraits acétonique (SAAC), méthanolique (SAME) et aqueux (SAAQ) des feuilles de *S. argel* à la dose de 250 mg/kg ont présenté une activité hypoglycémique significative à partir du 7^{ème} jour comparativement au groupe contrôle diabétique ($p < 0,0001$). Le taux de glycémie des rats traités respectivement par ces trois extraits a continué à diminuer jusqu'à atteindre un taux de glycémie normal au 21^{ème} jour comparatif à celui du groupe témoin non diabétique (**Tableau 29, Figure 65**).

Tableau 29 : Effets des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* sur le taux de glycémie.

Groupes	Dose (mg/kg)	Effet sur le taux de glycémie (mg/dl)				
		Initial	J7	J14	J21	J28
Contrôle négatif		100,83±8,5 ^a	107,16±4,5 ^a	109,5±5,83 ^a	106,33±3,66 ^a	103,45±8,3 ^a
Contrôle diabétique		295,16±19,11 ^b	291±22 ^b	282,83±19,22 ^b	268,16±20,55 ^b	266,78±21,1 ^b
Standard Metformine	250	300,16±5,27 ^b	290,16±8,44 ^{bd}	246,33±18,55 ^{bd}	173,5±34 ^a	120,55±6,2 ^a
SAAC	250	337,66±8,33 ^b	215±68 ^{cd}	186,66±27,55 ^{cd}	142,83±35,5 ^a	137,05±33,18 ^a
SAME	250	317,05±33,18 ^b	205±43 ^c	164,33±22,55 ^{ac}	148,33±19 ^a	117,88±21,68 ^a
SAAQ	250	327,83±30,16 ^b	201,5±59,16 ^c	155,83±33,16 ^{ac}	131±23 ^a	106,58±18 ^a

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

Le groupe standard recevant la metformine à la dose de 250 mg/kg a entraîné une réduction significative du taux de glycémie à partir du 14^{ème} jour pour atteindre au 21^{ème} jour un taux de glycémie normal similaire à celui du groupe témoin sain et ceux traités par les extraits de *S. argel* (Tableau 29, Figure 65).

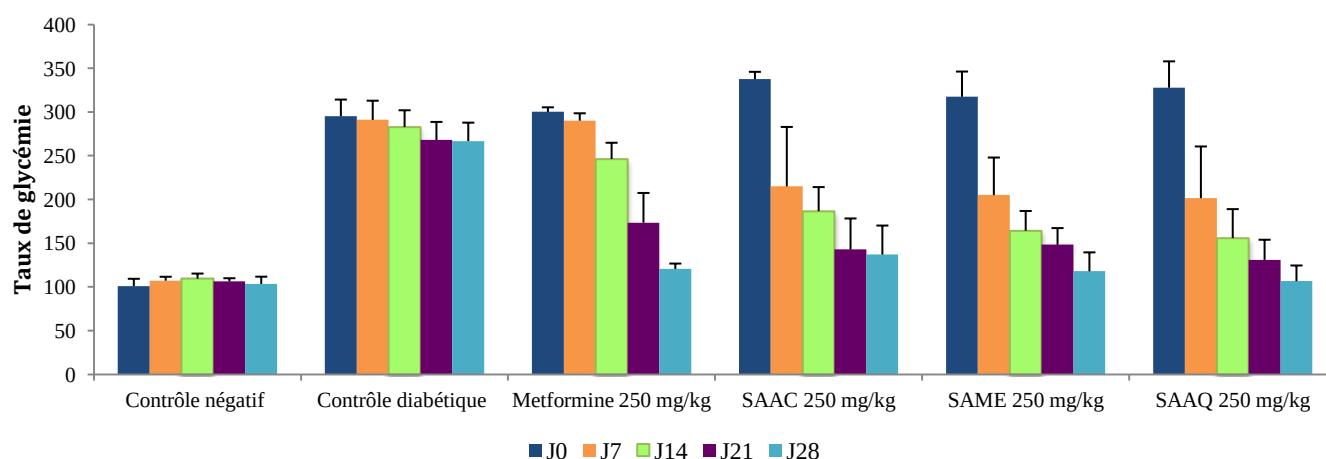


Figure 65 : Effets des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* sur le taux de glycémie

Par ailleurs, l'examen anatomopathologique a mis en évidence une nécrose massive du parenchyme pancréatique avec disparition des cellules β des îlots de Langerhans chez l'ensemble des lots ayant reçu de l'Alloxane, confirmant l'action diabétogénique de ce dernier sur ces groupes (Figure 66 (B), (C), (D), (E), (F)) ; comparativement au groupe contrôle non diabétique, chez lequel aucune lésion pancréatique n'a été signalée (Figure 66 (A)).

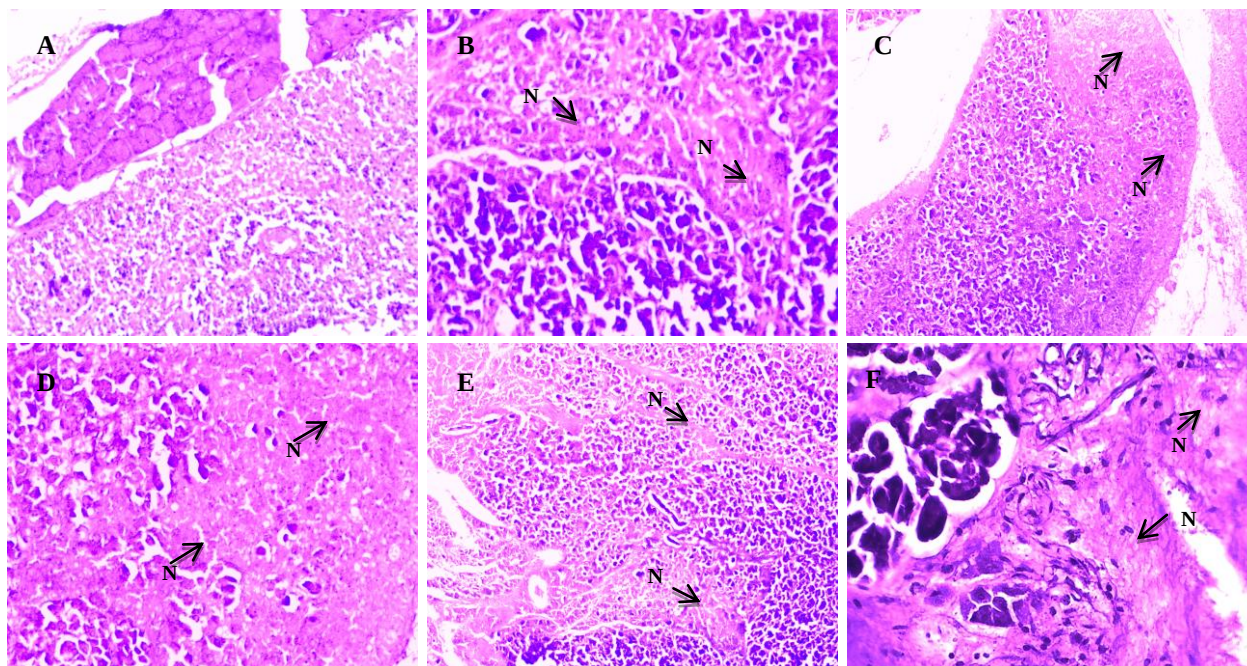


Figure 66 : Micrographies du pancréas, coupes histologiques colorées par l’Hematoxyline / Eosine.

(A): Témoin non diabétique x4, **(B):** Témoin diabétique x10, **(C):** Métformine 250 mg/kg x4, **(D):** SAAC 250mg/kg x10, **(E):** SAME 250 mg/kg x4, **(F):** SAAQ 250 mg/kg x40. N: Nécrose

2.3. Evaluation du profil lipidique

Dans le modèle du diabète induit par l’Alloxane, l’augmentation du taux de glycémie est accompagnée par une élévation des taux de cholestérol total et de triglycérides. Les taux de cholestérol total et de triglycérides ont été déterminés à la fin de la période expérimentale. Une diminution significative du taux de cholestérol total des rats traités respectivement par la metformine, l’extrait acétonique et l’extrait aqueux a été enregistrée.

Les rats traités par l’extrait méthanolique ont montré un taux de cholestérol total similaire à celui du groupe témoin. Par ailleurs, les rats traités par l’extrait acétonique ont présenté une diminution très significative du taux de triglycérides comparativement au groupe contrôle diabétique ($p < 0,0001$). Le taux de triglycérides enregistré chez les rats traités par la metformine et l’extrait aqueux est comparable à celui du groupe témoin. Les rats traités par l’extrait méthanolique ont présenté un taux de triglycérides intermédiaire entre le groupe témoin et le groupe contrôle diabétique. Enfin, une augmentation significative des taux de

cholestérol total et de triglycérides a été enregistrée chez les rats du groupe contrôle diabétique comparativement au groupe témoin ($p < 0,0001$) (**Tableau 30**).

Tableau 30 : Effets des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* sur le profil lipidique.

Groups	Dose (mg/kg)	Cholestérol total (g/l)	Triglycérides (g/l)
Contrôle négatif	-	0,83±0,27 ^a	2,12±0,73 ^{ab}
Contrôle diabétique	-	1,01±0,16 ^c	5,38±1,11 ^c
Standard Metformine	250	0,41±0,15 ^b	3,01±0,92 ^{ab}
SAAC	250	0,67±0,33 ^{ab}	1,93±0,34 ^b
SAME	250	0,82±0,20 ^a	3,28±0,34 ^a
SAAQ	250	0,76±0,11 ^{ab}	2,52±0,21 ^{ab}

Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type ($n=6$). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

2.4. Evaluation des fonctions hépatique et rénale

A la fin de la période expérimentale, les taux des enzymes hépatiques AST, ALT et PAL ainsi que les taux d'urée et de créatinine ont été déterminés afin d'évaluer les fonctions hépatique et rénale des rats mis en expérimentation. Les taux des enzymes hépatiques AST et ALT enregistrés chez les groupes traités par les extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que le groupe standard sont similaires à ceux du groupe contrôle négatif comparativement au groupe contrôle diabétique où une augmentation des taux sériques des enzymes AST et ALT a été constatée. De plus, aucune modification des taux de phosphatase alcaline n'a été enregistrée chez l'ensemble des groupes hormis pour le groupe traité par l'extrait acétonique.

Par ailleurs, une augmentation du taux d'urée a été déterminée chez les rats contrôle diabétique et ceux traités par la metformine comparativement au groupe témoin. Enfin, une augmentation du taux de créatinine a été enregistrée chez les rats contrôle diabétique (**Tableau 31**)

Tableau 31 : Effets des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* sur les fonctions hépatique et rénale.

Groups	Doses (mg/kg)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	ALP (UI/L)	Urée (g/l)	Créatinine (mg/l)
Contrôle négatif		61,10±12,21 ^a	46,01±6,77 ^a	31,36±1,48 ^a	0,43±0,04 ^a	9,18±0,96 ^{ac}
Contrôle diabétique		107,05±73,12 ^b	91,95±80,16 ^b	48,33±16,72 ^a	1±0,26 ^{bc}	9,45±1,31 ^a
Standard Metformine	250	60,42±13,64 ^a	38,11±12,87 ^a	49,47±23,07 ^a	1,09±0,33 ^c	8,36±0,59 ^{abc}
SAAC	250	54,14±26,65 ^a	54,38±19,31 ^a	82,66±2,47 ^b	0,64±0,23 ^a	9,16±1,32 ^{ac}
SAME	250	90,54±32,96 ^a	66,41±17,84 ^a	52,45±15,16 ^a	0,73±0,07 ^{ab}	7,22±0,30 ^{bc}
SAAQ	250	60,82±14,67 ^a	40,43±13,61 ^a	54,26±20,21 ^a	0,51±0,06 ^a	7,74±0,86 ^c

Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type ($n=6$). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

L'examen histopatologique du parenchyme hépatique a permis de mettre en évidence une congestion vasculaire prédominante chez le groupe contrôle diabétique non traité (**Figure 67 (B)**) et minimales chez les groupes metformine, SAME et SAAQ comparativement au contrôle non diabétique (**Figure 67 (C), (E), (F), (A)**). De plus, des lésions de type dilatation sinusoidale et stéatose hépatique ont été révélées, respectivement, chez les groupes SAME et SAAC (**Figure 67 (E), (D)**).

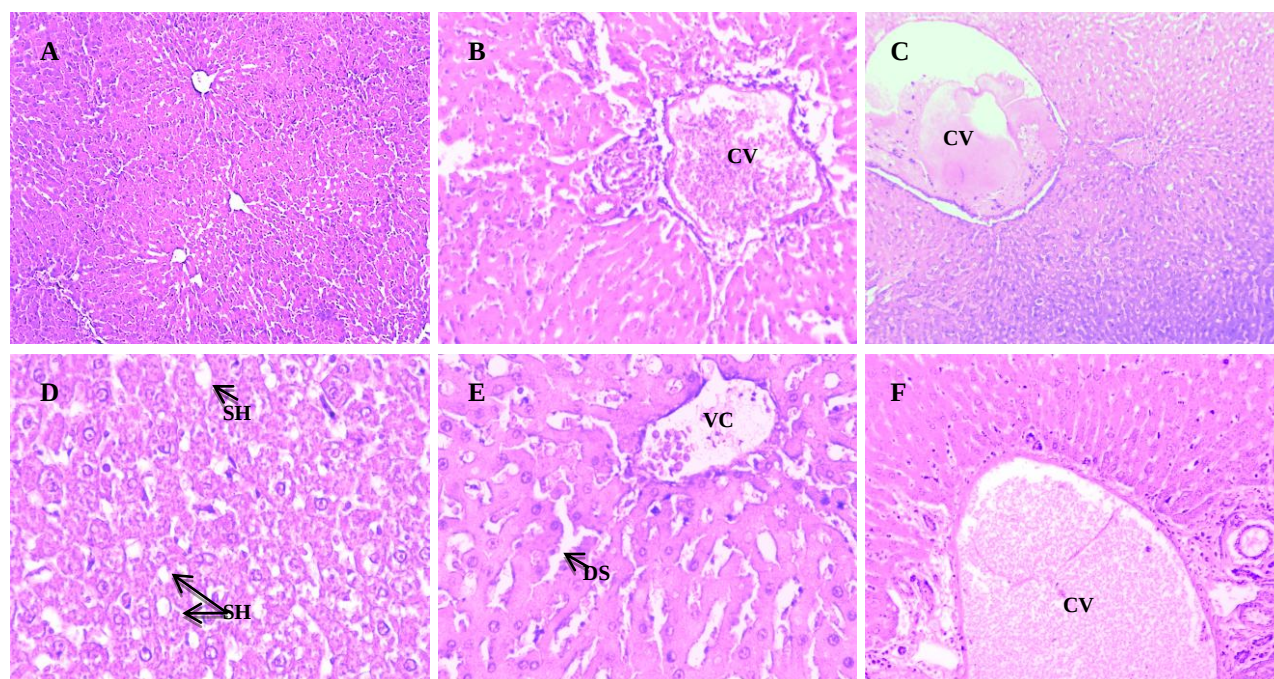


Figure 67 : Micrographies du foie, coupes histologiques colorées par l'Hematoxyline / Eosine.

(A): Témoin non diabétique x4, **(B):** Témoin diabétique, **(C):** Métformine 250 mg/kg, **(D):** SAAC 250mg/kg, **(E):** SAME 250 mg/kg, **(F):** SAAQ 250 mg/kg. **CV:** Congestion vasculaire, **SH:** Stéatose hépatique, **DS:** Dilatation sinusoidale.

Par ailleurs, l'examen anatomopathologique a révélé que le parenchyme rénal du groupe contrôle diabétique non traité est le siège de lésions de type nécrose tubulaire sous corticale et à moindre mesure chez le groupe SAME (**Figure 68 (B), (E)**). Aussi, une hyper-osmose tubulaire non pathologique a été enregistrée chez les groupes metformine et SAAQ (**Figure**

68 (C), (F)). Aucune lésion n'a été signalée chez les groupes contrôle non diabétique et SAAC (**Figure 68 (A), (D))**.

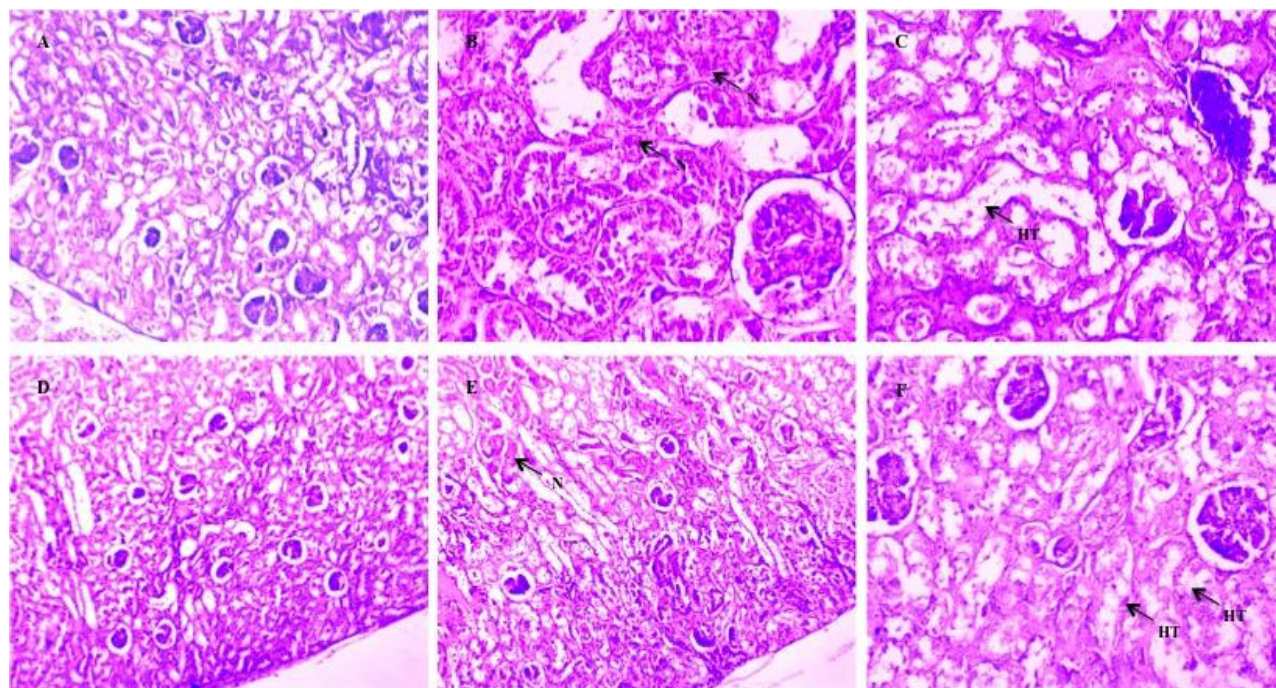


Figure 68 : Micrographies du rein, coupes histologiques colorées par l'Hematoxyline / Eosine.

(A): Témoin non diabétique x4, **(B):** Témoin diabétique, **(C):** Métformine 250 mg/kg, **(D):** SAAC 250mg/kg, **(E):** SAME 250 mg/kg, **(F):** SAAQ 250 mg/kg. **N:** Nécrose tubulaire sous corticale, **HT:** Hyper osmose tubulaire.

3.5. Evaluation de l'effet neuroprotecteur

3.5.1. Examen histologique

Les résultats de l'évaluation histopathologique de l'effet neuroprotecteur chez les rats diabétiques traités par les extraits SAAQ, SAAC et SAME sont présentés dans le **Tableau 32**. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le témoin non diabétique, le standard metformine et l'extrait aqueux de *S.argel* en termes d'absence de lésions au niveau du cortex cérébral, comparativement au témoin diabétique (**Tableau 32, figure 71**). De plus, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les extraits SAAC, SAME et le contrôle diabétique pour ce qui est des lésions d'apoptose et d'hémorragie.

Tableau 32 : Résultats de l'évaluation histopathologique de l'effet neuroprotecteur des extraits SAAQ, SAAC et SAME lors du diabète induit par l'Alloxane chez le rat

Groupes	Doses (mg/kg)	Dégénérescence	Apoptose	Gliose	Œdème	Hémorragie
Contrôle non diabétique	-	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a
Contrôle diabétique	-	2,83±0,37 ^b	1,00±0,58 ^b	1,17±0,37 ^b	0,83±0,9 ^a	1,67±1,11 ^b
Standard Metformine	250	0,33±0,47 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,33±0,47 ^a	0,00±0,00 ^a
SAAQ	250	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,33±0,47 ^a	0,00±0,00 ^a
SAAC	250	1,17±0,37 ^c	1,17±0,37 ^b	0,5±0,50 ^a	0,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^b
SAME	250	1,17±0,37 ^c	1,17±0,37 ^b	0,33±0,47 ^a	0,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^b

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

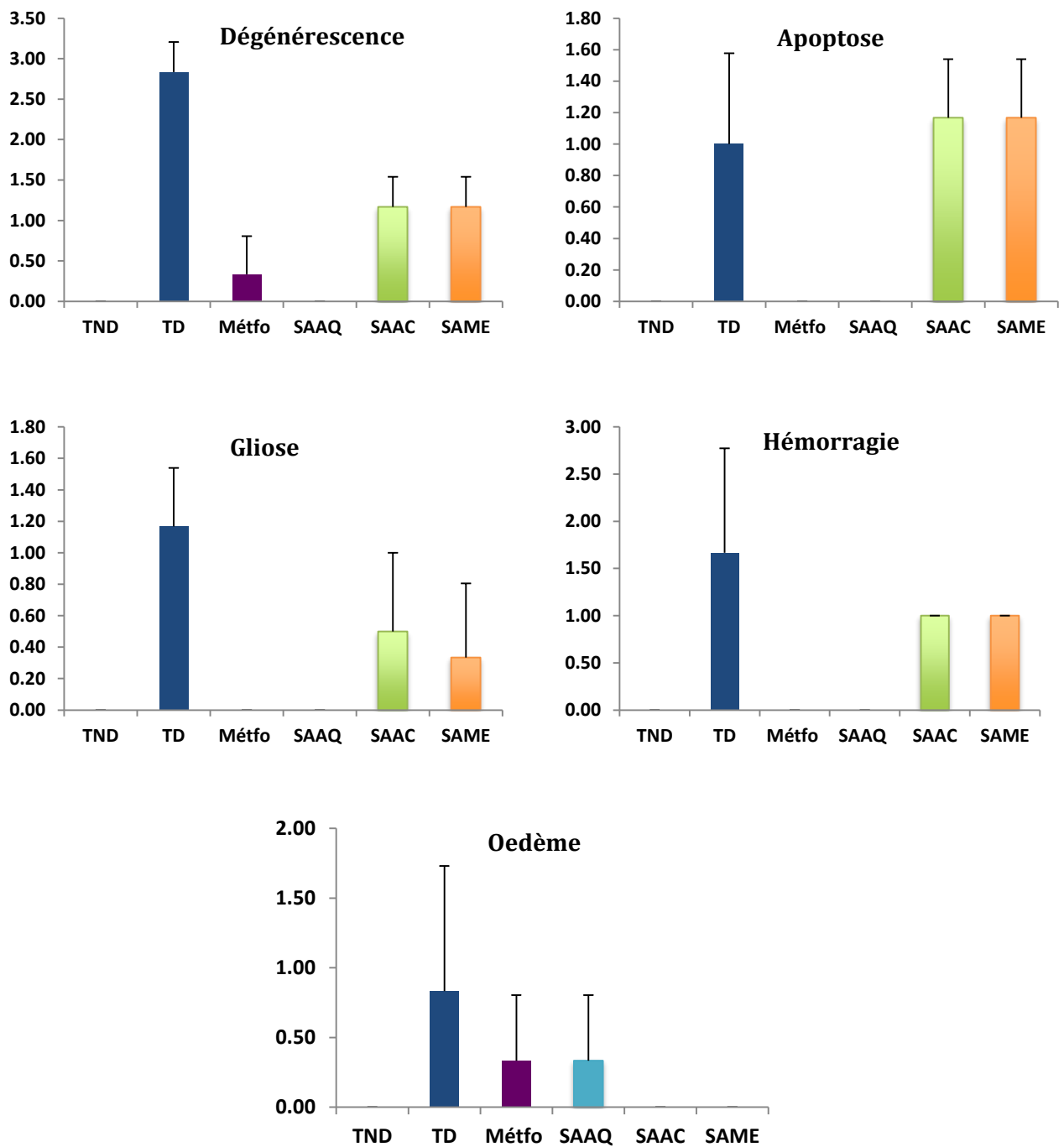


Figure 71 : Représentations graphiques des lésions recherchées au cours de la neuro-dégénérescence liée au diabète.

TDN : Témoin non diabétique, **TD**: Témoin diabétique, **Métfo**: Metformine, **SAAQ**: Extrait aqueux, **SAAC**: Extrait acétonique, **SAME**: Extrait méthanolique

Par ailleurs, les lésions histopathologiques enregistrées chez le groupe contrôle diabétique sont principalement de type dégénérescence neuronale caractérisée par des cellules ballonnets à noyaux pycnotiques avec une dégénérescence vacuolaire localisée entraînant une kystisation à

contenu éosinophile ainsi qu'une persistance et une accentuation de la fibrillation (gliose) (Tableau 32, figure 72).

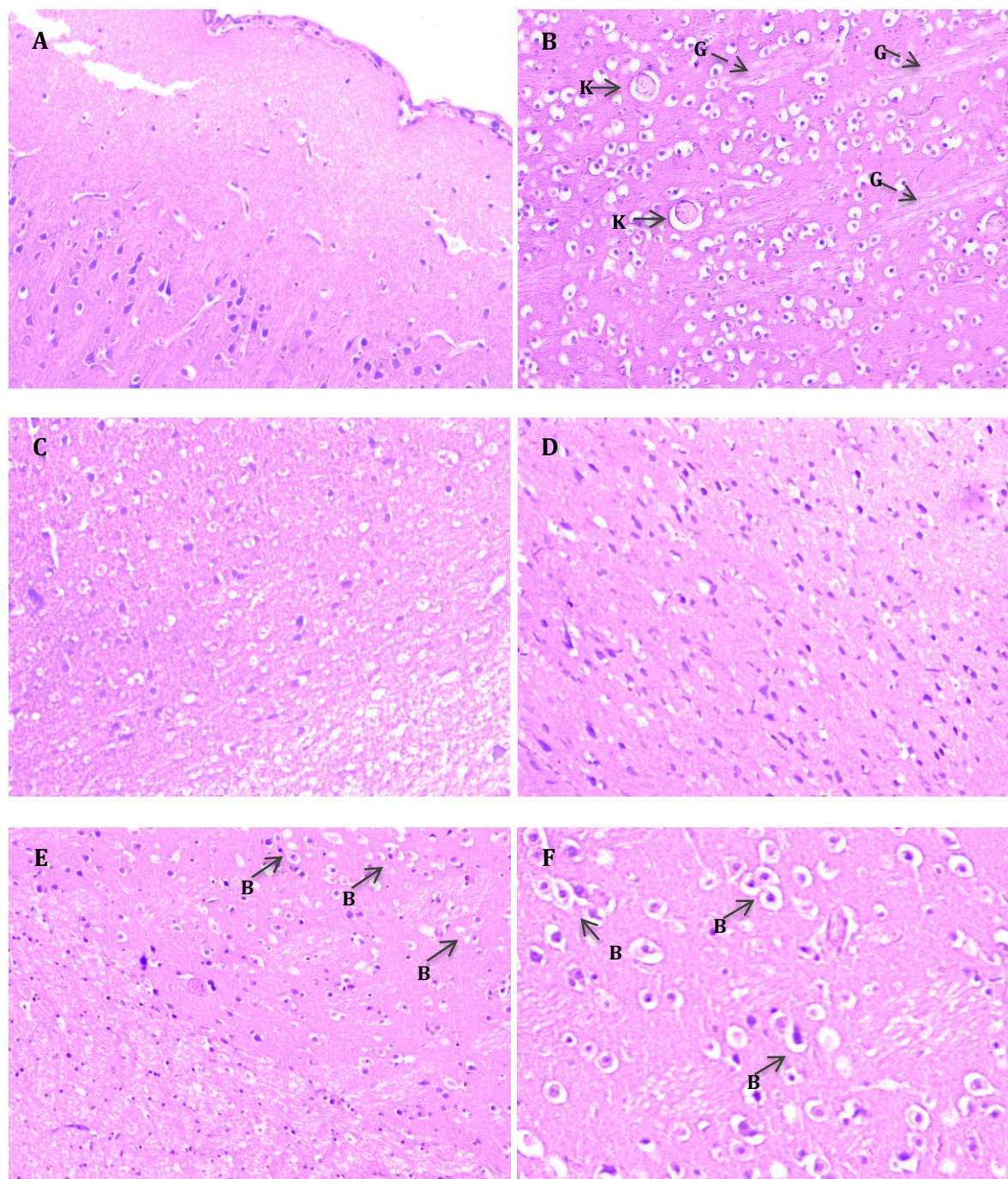


Figure 72 : Micrographies du cortex cérébral, coupes histologiques colorées par l'Hématoxyline / Eosine.

(A): Témoin non diabétique x20, **(B):** Témoin diabétique x20, **(C):** Metformine 250 mg/kg x20, **(D):** SAAQ 250mg/kg x20, **(E):** SAAC 250 mg/kg x10, **(F):** SAME 250 mg/kg x40. **K:** Kystisation des neurones, **G:** Gliose, **B:** Ballonisation des neurones

La coloration des coupes histologiques par le violet de crésyl a permis de mettre en évidence la proportion de neurones viables dans le cortex cérébral des groupes mis en expérimentation. Une proportion importante de neurones viable a été signalée chez les groupe contrôle non diabétique, metformine et SAAQ (**Figure 73 (A), (C),(D)**), et à moindre mesure chez les groupes SAAC et SAME, comparativement au contrôle diabétique non traité (**Figure 73 (B), (E), (F)**).

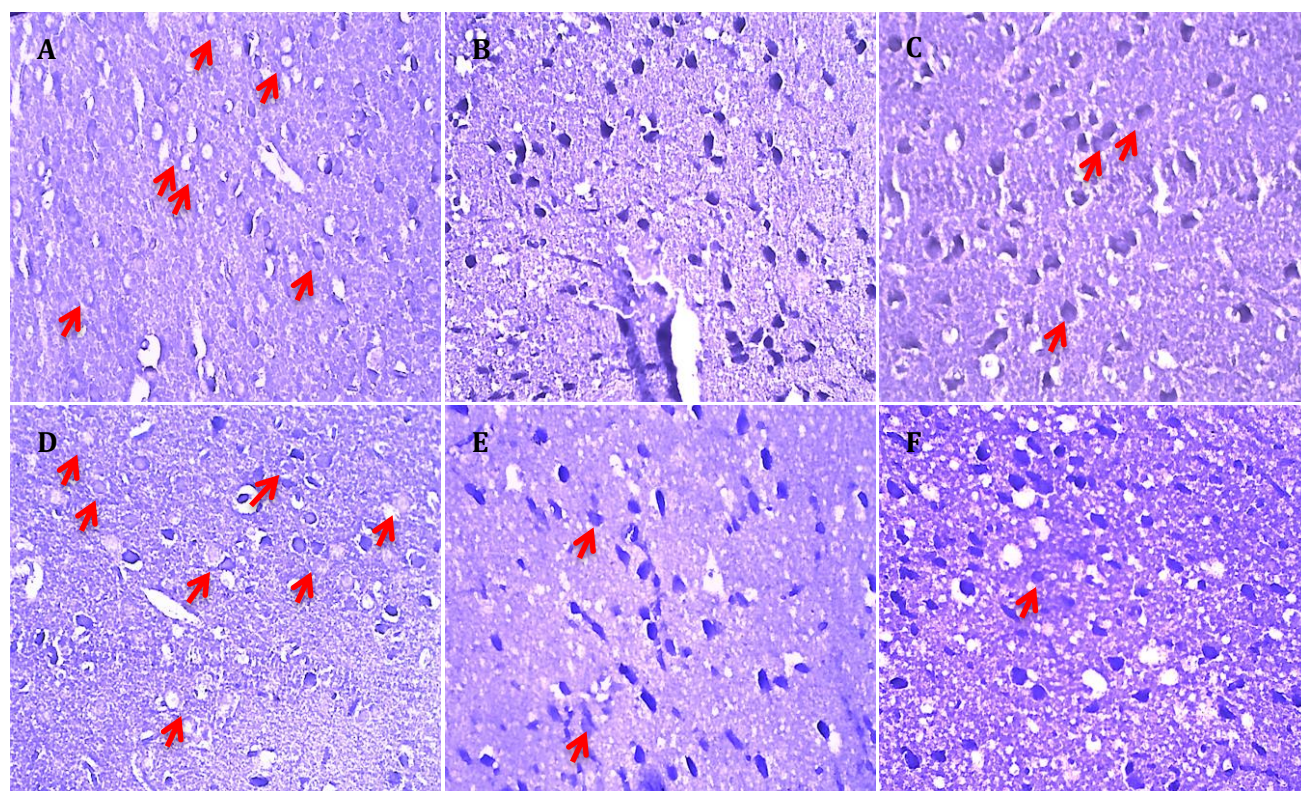


Figure 73 : Micrographies du cortex cérébral, coupes histologiques colorées par le violet de crésyl.

(A): Témoignage non diabétique x40, **(B):** Témoignage diabétique x40, **(C):** Metformine 250 mg/kg x40, **(D):** SAAQ 250mg/kg x40, **(E):** SAAC 250 mg/kg x40, **(F):** SAME 250 mg/kg x40. **Flèches rouges:** Neurones viables.

3.5.2. Immunohistochimie

Les résultats obtenus pour l'immunohistochimie du cortex cérébral des rats pour l'anticorps HSP70 sont présentés sous forme de moyennes arithmétiques $\pm$ les écart-types des scores de l'intensité de coloration par l'HSP70 (**Tableau 33**). Les résultats sont également présentés sous forme de graphe et de microphotographies (**Figures 74 et 75**).

Tableau 33 : Intensité d'expression de la HSP70 suite à l'immunohistochimie du cortex cérébral chez les différents groupes mis en expérimentation

	Témoin non diabétique	Témoin diabétique	Metformine 250 mg/kg	SAAQ 250 mg/kg	SAAC 250 mg/kg	SAME 250 mg/kg
Intensité d'expression de la HSP70	0±0 ^a	3±0 ^b	1±0,57 ^c	0,66±0,47 ^{ac}	2,33±0,47 ^b	2,66±0,47 ^b

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type (n=6). Les chiffres avec des lettres identiques montrent une différence non-significative après analyse ANOVA suivie par le test de Tukey.

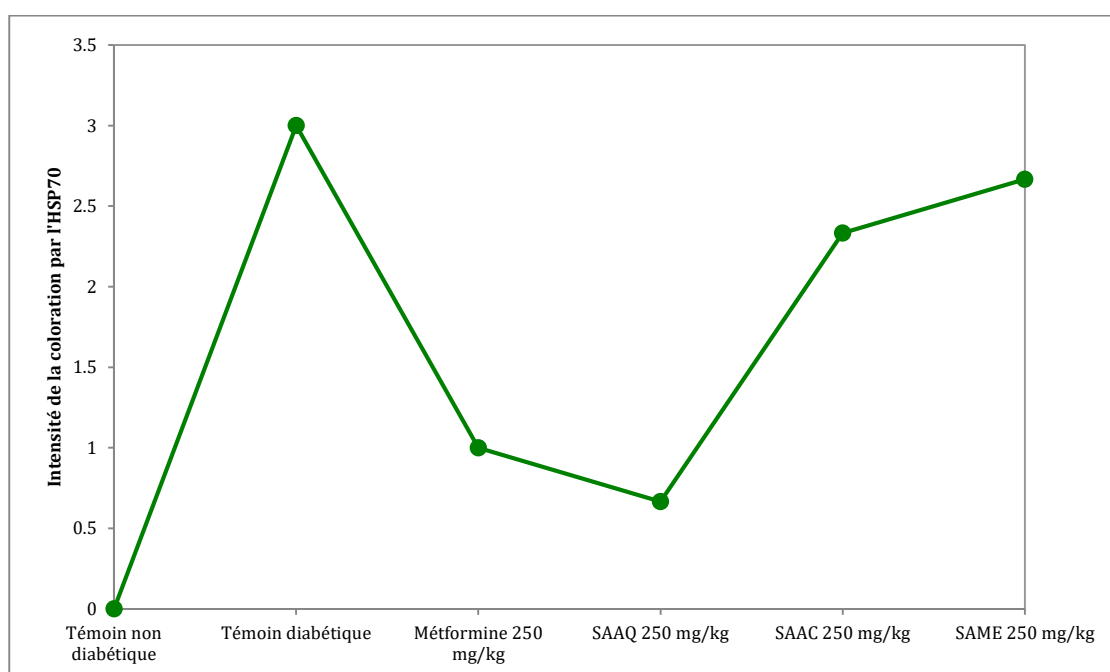


Figure 74 : Intensité d'expression de la HSP70 au niveau du cortex cérébral pour les différents groupes mis en expérimentation

Tous les groupes hormis le groupe contrôle non diabétique ont enregistré une positivité, cette dernière diffère d'un groupe à un autre selon l'intensité et l'étendue de la coloration par l'HSP70. En effet les groupes contrôle diabétique et ceux traités par les extraits acétonique et méthanolique de *S.argel* ont révélé une forte intensité de la coloration par l'HSP70 visible avec un objectif de faible puissance et impliquant plus de 50 % des cellules, comparativement au groupe contrôle non diabétique ($p<0,0001$) (**Tableau 33, Figure 75 (B), (E), (F)**).

Par ailleurs, le groupe standard metformine et celui traité par l'extrait aqueux de *S.argel* ont exprimé une faible intensité de la coloration par l'HSP70 sous forme de foyers modérés dans moins de 50 % des cellules, avec une différence peu significative pour la metformine ($p=0,007$) et non significative pour l'extrait aqueux de *S. argel* ($p=0,13$) comparativement au témoin non diabétique (**Tableau 33, Figure 75 (C), (D)**).

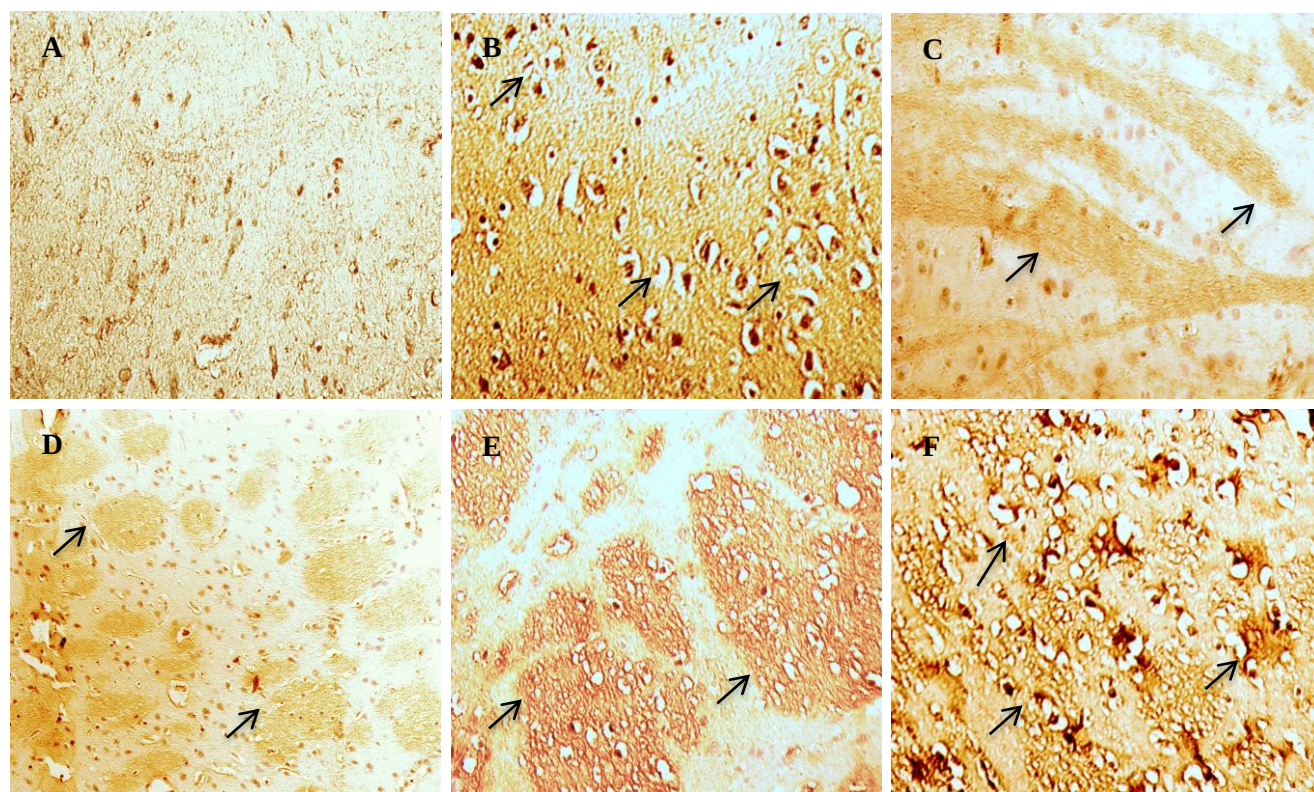


Figure 75 : Micrographies du cortex cérébral, coupes histologiques colorées par l'HSP70.

(A): Témoin non diabétique x20, **(B):** Témoin diabétique x40, **(C):** Metformine 250 mg/kg x10, **(D):** SAAQ 250mg/kg x10, **(E):** SAAC 250 mg/kg x40, **(F):** SAME 250 mg/kg x40. **Flèche noire :** Positivité.

4. Discussion

Le diabète sucré est un des troubles métaboliques les plus connus, caractérisé par une hyperglycémie chronique et des troubles du métabolisme des glucides, des graisses et des protéines associées à un déficit absolu ou relatif de la sécrétion et/ou de l'action de l'insuline (**Elkotby et al., 2017**).

Le diabète induit par l'alloxane est l'un des modèles largement utilisés pour induire le diabète sucré de type I chez les animaux de laboratoire. L'alloxane s'est révélé sélectivement toxique pour les cellules β pancréatiques en s'accumulant sous forme d'analogue du glucose, provoquant ainsi une réduction massive des cellules des îlots de Langerhans et induisant, par conséquent, une hyperglycémie. De plus, l'action cytotoxique de l'alloxane est principalement médiée par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (**Ankur and Shahjad, 2012**).

La présente étude a permis de mettre en évidence un effet hypoglycémique significatif des extraits acétonique, méthanolique et aqueux des feuilles de *S. argel* à la dose de 250 mg/kg. Cet effet hypoglycémique enregistré est similaire à celui du standard metformine à la dose de 250 mg/kg. Les extraits de *S. argel* pourraient agir en augmentant la production d'insuline à partir des cellules β des îlots de Langerhans restantes ou en activant la réponse de l'insuline plasmatique chez les rats diabétiques induits par l'alloxane (**Pramod et al., 2016**).

Le diabète induit par l'alloxane entraîne une altération du métabolisme lipidique caractérisée par une élévation des taux de cholestérol total et de triglycérides (**Nawale et al., 2017 ; Amraie et al., 2015**). L'hypertriglycéridémie observée chez les rats diabétiques induits par l'alloxane peut être due à une augmentation de l'absorption et de la formation de triglycérides ou à une diminution de leur utilisation dans les tissus périphériques, alors que l'hypercholestérolémie peut être attribuée à une augmentation des voies enzymatiques altérées pour le métabolisme du cholestérol ou à une augmentation de l'absorption du cholestérol alimentaire (**Nawale et al., 2017**).

Les résultats de cette étude montrent une diminution significative des taux sériques de cholestérol total (CT) et de triglycérides (TG) chez les rats diabétiques traités respectivement par les extraits acétonique, méthanolique et aqueux à la dose de 250 mg/kg, comparativement aux

rats diabétiques non traités. Les extraits de *S. argel* pourraient agir en abaissant les taux de TG et de CT en augmentant l'activité de l'enzyme lipase et l'utilisation du cholestérol et des triglycérides dans les tissus périphériques.

Par ailleurs, le foie joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de la glycémie, en équilibrant l'absorption, le stockage et la production de glucose via la glycogénèse, la glycogénolyse et la gluconéogenèse (**Ji-Li Fang et al., 2020**). L'administration d'alloxane entraîne une augmentation considérable des biomarqueurs de la fonction hépatique tels que la PAL, l'ALT et l'AST (**Udayakumar et al., 2009**).

Les résultats de la présente étude montrent une élévation des taux sériques des enzymes ALT et AST chez les rats diabétiques non traités comparativement aux groupe contrôle négatif et ceux traités par les extraits de *S. argel*, chez lesquels des taux normaux de ces enzymes ont été enregistrés. En effet, l'augmentation des niveaux des enzymes hépatiques ALT et AST peut être due à une fuite du cytosol vers la circulation sanguine ; une fuite augmentée par des lésions hépatiques causées par le diabète (**Amraie et al., 2015**).

Le rein est l'organe responsable du maintien d'une composition chimique optimale des fluides corporels par acidification de l'urine et élimination des déchets métaboliques tels que l'urée, l'acide urique, la créatinine et les ions. Lors des maladies rénales, la concentration de ces métabolites augmente dans le sang (**Virdi et al., 2003**). Au cours de cette étude, une augmentation du taux d'urée a été enregistrée chez les groupes contrôle diabétique et metformine, alors qu'une élévation du niveau sérique de créatinine a été déterminée chez le groupe contrôle diabétique comparativement aux autres groupes. L'augmentation de ces paramètres pourrait être la conséquence de dommages tissulaires par peroxydation lipidique au niveau rénal suite à l'induction du diabète par l'alloxane (**Amraie et al., 2015**).

Les résultats de l'étude anatomopathologique des tissus hépatiques et rénaux corroborent les données biochimiques dans la mesure où les lésions prédominantes ont été enregistrées chez le groupe contrôle diabétique non traité comparativement aux autres groupes traités chez lesquels les lésions retrouvées sont non significatives.

Parmi les complications rencontrées au cours du diabète sucré, l'atteinte neurologique fait partie des problèmes fréquents, entraînant des troubles du comportement, une dégradation des fonctions cognitives ainsi que des troubles vasculaires au niveau du cerveau (**Ali Sangi et al., 2019**). Au cours de cette étude, des lésions de dégénérescence neuronale et d'apoptose ont été rapportées au niveau du cortex cérébral des rats traités par les extraits SAAC et SAME ainsi que chez le contrôle diabétique. Ces lésions pourraient être la conséquence d'une réaction oxydative engendrée par l'augmentation du taux de glucose sérique.

En effet l'hyperglycémie entraîne une augmentation de la production des radicaux libres par l'activation d'une voie de signalisation impliquant le diacylglycérol (DAG), la protéine kinase C (PKC) et la NADPH-oxydase (**Volpe et al., 2018**). De plus, les niveaux élevés de glucose sérique génèrent la formation de produits finaux de la glycation avancée (AGE), ces derniers ont un effet toxique sur les neurones. En effet, ils induisent des dommages oxydatifs en se liant aux radicaux libres, provoquant ainsi des lésions neuronales (**Umegaki, 2012**). Le système nerveux étant particulièrement sensible au stress oxydatif, ce dernier est à l'origine des processus de dégénérescence neuronale observés au court du diabète (**Yuan and Yankner, 2000 ; Ali Sangi et al., Jalaud, 2019**).

Par ailleurs, plusieurs études sur le diabète ont permis de révéler des signes d'apoptose au niveau des neurones activés par le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie (**Edwards et al., 2008; Mohamed et al., 2014**) et les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , les chimiokines, l'interleukine (IL)-1 β , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-18) (**Volpe et al., 2018**). Le médiateur inflammatoire HMGB-1 est également impliqué dans le processus d'apoptose en activant le récepteur des AGE et le TLR4, entraînant ainsi l'activation de NF-kB qui conduit à une régulation à la hausse des cytokines pro-inflammatoires (**Volpe et al., 2018**).

L'extrait SAAQ a entraîné un effet neuroprotecteur très significatif, qui pourrait être dû à une régulation à la baisse du stress oxydatif par inhibition de la production de radicaux libres et d'AGE. Le standard metformine a également enregistré un bon effet neuroprotecteur, ce résultat corrobore ceux obtenus par des études antérieures. La metformine préviendrait les dommages cérébraux en réduisant la charge oxydative des neurones par minimisation de l'utilisation du NADH en agissant sur la réduction de la phosphorylation oxydative via l'inhibition du complexe I dans les mitochondries et la gluconéogenèse (**Rotermund et al., 2018; Li et al., 2022**).

La Protéine chaperonne HSP-70, aussi connue sous le nom de protéine de choc thermique 70 (**Guven et al., 2009**) est retrouvée dans le réticulum endoplasmique, les mitochondries, le cytosol et le milieu extracellulaire et elle s'exprime en réponse à un stress thermique, un stress oxydatif, un stress métabolique ou un stress ischémique (**Emery and Dobrowsky, 2016**). Suite à un stress cellulaire, une translocation de la HSP70 intracellulaire (iHSP70) hors de la cellule se produit et devient HSP70 extracellulaire (eHSP70) via divers mécanismes (**Mulyani et al., 2020**). Ainsi, la modulation des pools intra et extracellulaire de la HSP70 reste un aspect important dans la mesure où ça peut affecter la progression d'une pathologie (**Emery and Dobrowsky, 2016**).

Dans la présente étude, la technique d'immunohistochimie par l'anticorps anti-HSP70 a été réalisée afin de mettre en évidence le retentissement du diabète sur le cerveau des rats traités, respectivement, par les extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel*. Les groupes contrôle diabétique, SAAC et SAME ont exprimé une immunoréactivité très significative de l'HSP70 proportionnelle aux lésions relevées lors de l'examen histopathologique de ces derniers. La forte immunoréactivité exprimée par ces groupes pour l'HSP70 pourrait être dû à la présence en grande quantité de l'eHSP70 au niveau du cortex cérébral.

En effet, plusieurs études antérieures ont prouvé qu'une diminution de l'expression de l'iHSP70 et une augmentation de l'expression de l'eHSP70 sont observées au cours des troubles métaboliques, notamment le diabète (**Kurucz et al., 2002; Bruce et al., 2003; Emery and Dobrowsky, 2016; Mulyani et al., 2020**). Par ailleurs, les groupes extrait aqueux et metformine ont exprimé une faible expression de la HSP70. Cette faible expression pourrait être dû à la présence de l'eHSP70 en faible quantité dans le cortex cérébral des rats traités, respectivement, avec l'extrait aqueux et la metformine.

Cette faible immunoréactivité semble être proportionnelle aux quelques foyers d'œdème relevés lors de l'examen histopathologique du cortex cérébral de ces groupes. En effet, les effets de l'eHsp70 sont généralement immunostimulants, pro-inflammatoires et favorisent le stress oxydatif contrairement à ceux de l'iHSP70 (**Krause et al., 2015**). L'eHSP70 joue un rôle de ligand pour les récepteurs TLR2 et TLR4 ce qui entraîne l'activation des voies MyD88 et TIRAP conduisant à une régulation négative du NF- κ B via IRAK4, TRAF6 et IKK et l'activation du

JNK via MEKK 4/7, ce qui déclenche la réaction inflammatoire (**Mulyani et al., 2020**). Les signaux de l'eHSP70 stimulent également une multitude de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α) et la production de NO (**Emery and Dobrowsky, 2016**).

Dans la présente étude, les résultats de l'immunohistochimie par l'anticorps anti-HSP70 corroborent ceux obtenus à l'examen histopathologique et permettent de confirmer que parmi les trois extraits testés, seul l'extrait aqueux de *S. argel* possède un pouvoir neuroprotecteur.

L'effet antidiabétique des extraits acétonique, méthanolique et aqueux des feuilles de *S. argel* peut être le résultat de l'action synergique des composants majoritaires en commun de ces extraits.

Les flavonoïdes présents en grande majorité dans ces trois extraits peuvent être à l'origine des effets hypoglycémiant et hypolipémiant observés. En effet, l'action des flavonoïdes sur le diabète a été étudiée en détail dans le processus global du métabolisme des glucides, ainsi que leurs rôles dans le réseau de signalisation complexe de l'action de l'insuline (**Chen et al., 2015**).

La quercétine présente dans la composition des trois extraits pourrait participer aux effets hypoglycémiant et hypolipémiant enregistrés, elle agirait en protégeant les cellules β contre les dommages ; en promouvant la synthèse du glycogène (**Chen et al., 2015 ; Vessal et al., 2003**) en inhibant l' α -glucosidase (**Chen et al., 2015 ; Li et al., 2009**) et en réduisant la lipoperoxydation (**AL-Ishaq et al., 2019**).

Le kaempferol également présent dans les trois extraits, possède plusieurs effets antidiabétiques, tels que l'amélioration de l'expression et l'activation des protéines cellulaires activées par l'AMP, la réduction de l'apoptose cellulaire en supprimant les activités de la caspase 3 et l'augmentation de la production et de la sécrétion d'insuline par les cellules β (**AL-Ishaq et al., 2019**). De plus, le kaempferol améliore l'absorption cellulaire du glucose par les voies des protéines kinases C et PI3K, et la synthèse de nouveaux transporteurs de glucose (**AL-Ishaq et al., 2019 ; Zanatta et al., 2008**).

La rutine un des plus important flavonoïde composant les extraits SAAC, SAME et SAAQ présente lui aussi des effets antidiabétiques comprenant la réduction de l'absorption des glucides par l'intestin grêle par inhibition de l' α -glucosidase et l' α -amylase, l'amélioration de l'absorption

du glucose par les tissus, la suppression de la gluconéogenèse tissulaire, l'activation de la sécrétion d'insuline par les cellules et la protection des îlots de Langerhans des changements dégénératifs (AL-Ishaq *et al.*, 2019 ; Ghorbani, 2017). La rutine possède non seulement une activité antidiabétique mais également un effet hypolipidémique. En effet, la rutine a un effet bénéfique sur les lipides, les lipoprotéines, les enzymes métabolisant les lipides et les glycoprotéines (Mainzen Prince and kannan, 2006).

Par ailleurs, le Kaempferol-3-O-rutinoside composant majoritaire des trois extraits, objet de l'étude, possède un puissant effet antidiabétique. En effet, l'étude réalisée par Habtemariam (2011) a montré que le Kaempferol-3-O-rutinoside est un puissant inhibiteur de l' α -glucosidase *in vitro*. De plus, le Kaempferol-3-O-rutinoside a présenté un effet synergique avec les flavonoïdes aglycones le kaempferol et la quercétine (Habtemariam, 2011). L'existence du kaempferol et de la quercétine et la présence du Kaempferol-3-O-rutinoside dans les trois extraits étudiés pourraient corroborer les résultats obtenus par Habtemariam (Habtemariam, 2011).

Enfin, les saponines présentes dans la composition des trois extraits étudiés peuvent également participer à l'action antidiabétique observée. En effet, les saponines sont connues pour être actives contre le diabète (Smith and Adanlawo, 2012). Le mécanisme antidiabétique de ces saponines consisterait en une diminution de la glycémie et une augmentation des taux d'insuline plasmatique (Altinterim, 2012). Les saponines exerceraient leur action hypoglycémique en régénérant l'action de l'insuline et en modifiant sa signalisation, en libérant l'insuline des cellules β , en inhibant l'activité du disaccharide, en activant la synthèse du glycogène et en inhibant la gluconéogenèse, l'activité de l' α -glucosidase et l'expression de l'ARNm de la glycogène phosphorylase et de la glucose 6-phosphatase (El Barky *et al.*, 2017).

5. Conclusion

L'évaluation des activités antidiabétique et neuroprotectrice des extraits acétonique, méthanolique et aqueux des feuilles de *S. argel* a permis de mettre en évidence l'effet hypoglycémiant de ces derniers ainsi que l'effet neuroprotecteur de l'extrait aqueux.

Cas et Essais Cliniques

Cas Cliniques

Cas I : Dermatite scrotale à *Malassezia pachydermatis* chez un Labrador Retriever

1. Introduction

Le genre *Malassezia* est composé d'un groupe de levures lipophiles saprophytes de la peau et pathogènes cutanés opportunistes d'une variété de mammifères et d'oiseaux. Ces levures deviennent pathogènes lorsque l'équilibre entre leur multiplication et leur élimination est rompu à la faveur de certains facteurs favorisants, notamment, la baisse des défenses immunitaires, la présence de plis cutanés marqués, des états kératoséborrhéiques et une humidité excessive (Velegaki, 2015 ; Hobi *et al.*, 2022).

2. Présentation du cas

Filou un chien Labrador Retriever entier âgé de 6 ans, sans antécédents pathologiques, est présenté en consultation pour un prurit en région scrotale, apparu progressivement trois jours avant. Le chien vit en compagnie d'un caniche et d'un chat dans une maison avec accès libre sur un jardin. Il reçoit une alimentation à base de poulet, de riz et de légumes. Filou est correctement vacciné et vermifugé.

3. Examen clinique

L'examen clinique général n'a révélé aucune anomalie. Par ailleurs, l'examen cutané a permis de mettre en évidence la présence d'un érythème et d'une hyperpigmentation cutanée avec lichénification au niveau de la région scrotale (Figure 76).



Figure 76 : Erythème, hyperpigmentation et lichénification du scrotum

4. Examens complémentaires

Afin de mettre en évidence l'agent pathogène en cause, des grattages cutanés ont été réalisés au niveau de la zone lésée, en vue d'étudier l'hypothèse d'une dermatite parasitaire. L'examen direct au microscope optique, après coloration des prélèvements au bleu de lactophénol a révélé la présence de nombreuses levures

de formes sphérique ou ovale avec parfois des bourgeonnements unipolaires par champs et l'absence de filaments vrais ou de pseudo-filaments (**Figure 77**). La culture de la levure a été réalisée sur un milieu sabouraud additionné de glucose après une période d'incubation de sept

jours à 30°C. les colonies obtenues sont de couleur blanchâtre, mates et plus ou moins lisses. Plusieurs colonies non-adhérentes à la gélose ont été mises en évidence. Tous ces éléments sont caractéristiques de la levure *Malassezia pachydermatis* (**Figure 77**).

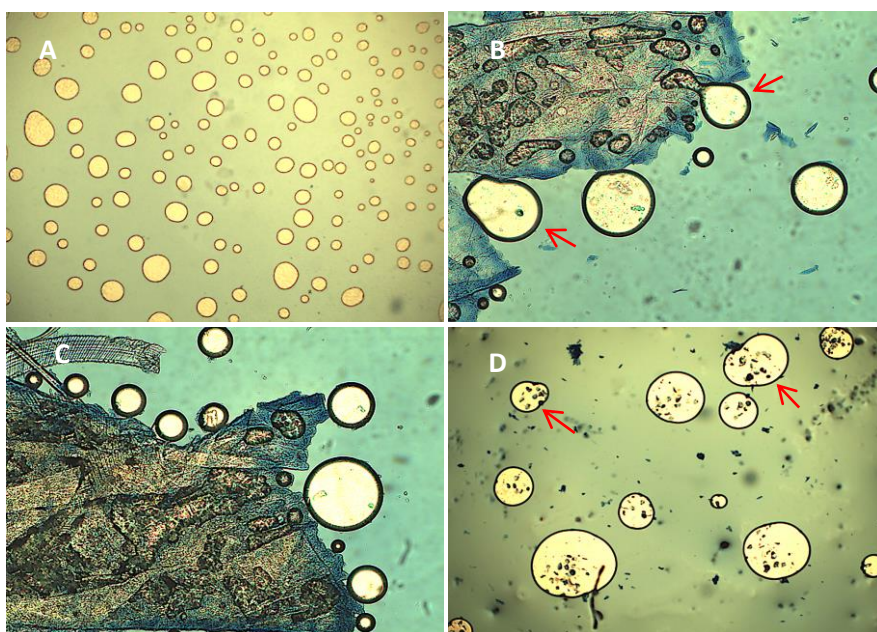


Figure 77 : Microphotographies des levures *Malassezia pachydermatis* à partir des prélèvements cutanés réalisés au niveau du scrotum.

A: x4; B: x10; C: x10; D: x10. Flèches rouges: début de bourgeonnement.

V. Traitement

Une antibiothérapie prophylactique à base de céfalexine a été instaurée à raison de 25 mg/kg deux fois par jour pendant 7 jours.

Un traitement topique adapté à la dermatite à *Malassezia* a été mise en place sous forme de crème à base de kétoconazole à raison d'une application tous les deux jours, après avoir assuré une hygiène

cutanée attentive de la zone atteinte. Une désinfection du lieu de couchage du chien a été également effectuée.

Dix jours plus tard, une amélioration de l'état de la peau scrotale a été observée avec une nette régression de l'hyperpigmentation et de la lichénification. Cependant, une importante

plaie ulcérée a fait son apparition sur presque la totalité du scrotum, ce qui a conduit à l'arrêt immédiat du traitement local en cours (**Figure 78**).



Figure 78 : Plaie ulcérée au niveau du scrotum

Face à cette situation critique, l'instauration d'un traitement topique alternatif sous forme de crème à base de l'huile essentielle de *S. argel* à 1%, a été entrepris à raison d'une application par jour. Une nette amélioration fut constatée dès la première application, avec obtention d'une cicatrisation spectaculaire en seulement 6 jours de traitement. L'évolution dans le temps de la surface de la plaie est représentée dans la **Figure 79**.

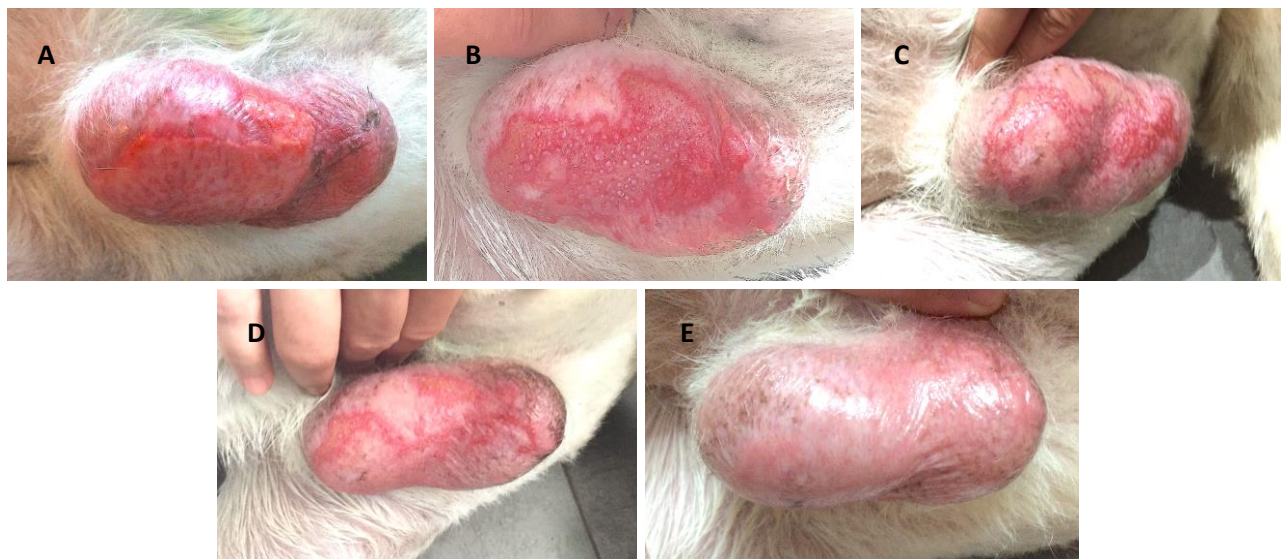


Figure 79 : Photos représentatives de l'évolution dans le temps du processus de cicatrisation de la plaie ulcérée traitée par la crème SAHE 1%.

A: J0, **B:** J2, **C:** J3, **D:** J4, **E:** J6.

6. Conclusion

L'utilisation de la crème à base de l'huile essentielle de *S. argel*, dans le présent cas, a permis une cicatrisation rapide et complète de la plaie ainsi que la disparition de l'hyperpigmentation induite par *Malassezia pachydermatis*.

Cas II : Efficacité de la crème à base de l'huile essentielle de *Solenostemma argel* sur une brûlure de troisième degré chez un chat

1. Introduction

Les brûlures sont des lésions douloureuses pouvant entraîner des dommages partiels ou complets à la peau, leur gravité dépend de la profondeur et de la taille de la surface corporelle affectée (**Lukan & Erjavec, 2022**). Les brûlures peuvent avoir différentes origines parmi lesquelles une exposition à la chaleur (brûlures thermiques), à l'électricité, à des produits chimiques ou à des radiations (**Frantz, 2011**). Les causes courantes de brûlures chez les animaux de compagnie sont les accidents domestiques mais il existe également de nombreux rapports sur l'utilisation de bistouris et de coussins chauffants électriques pendant la chirurgie (**Tello, 2011**).

II. Présentation du cas

Il s'agit du cas d'un chat siamois adulte, abandonné pour cause d'une brûlure sévère au niveau de la patte postérieure gauche. Il a été récupéré et hospitalisé au niveau de la clinique vétérinaire du jardin d'essai d'El Hamma. Ses antécédents pathologiques et son profil vaccinal ne sont pas connus vu ses conditions d'abandon.

3. Examen clinique

L'examen général a révélé un état cachectique de l'animal, une absence de déshydratation et des constantes physiologiques normales. L'examen cutané a permis de mettre en évidence une brûlure locale au niveau de l'extrémité de la patte postérieure gauche (<20% de la surface corporelle) très profonde (brûlure au troisième degré) avec une perte de substance impliquant l'épiderme, toutes les couches du derme, les tissus sous-cutanés, les muscles et les os (**Figure 80**).



Figure 80 : Brûlure au troisième degré

4. Examens complémentaires

Aucun examen complémentaire n'a été effectué.

5. Traitement

Le chat a été hospitalisé et mis sous antibiothérapie de couverture à base de céfalexine à raison de 25 mg/kg deux fois par jours pendant 10 jours. Un traitement local a été instauré par l'équipe vétérinaire du zoo du jardin d'essai sous forme d'une asepsie quotidienne par un antiseptique type Dakin ainsi que l'application d'une émulsion protectrice à base de Trolamine (Biafine®). La brûlure a été par la suite recouverte par un pansement vaseliné stérile (tulle gras) et un bandage. Ce traitement local a été maintenu pendant une période de 15 jours sans amélioration notable. Suite à cela, un traitement alternatif à base de la crème à 1% d'huile essentielle de *S.argel* a été appliqué quotidiennement pendant une période de 10 jours (**Figure 81**).



Figure 81 : Traitement de la brûlure par la crème SAHE 1%

Les résultats obtenus sont très satisfaisants dans la mesure où la crème à base de *S.argel* a permis une régénération tissulaire importante, recouvrant ainsi les phalanges mises à nu et une repousse des poils. L'évolution dans le temps du processus de cicatrisation de la brûlure est représentée dans la **figure 82**.



Figure 82 : Photos représentatives de l'évolution dans le temps du processus de cicatrisation de la brûlure traitée par la crème SAHE 1%. **A:** J0, **B:** J2, **C:** J4, **D:** J6, **E:** J8.

6. Conclusion

Les brûlures ne représentent pas les cas les plus fréquents en consultations vétérinaires, cependant, lorsqu'elles existent il est primordial de trouver la meilleure solution thérapeutique afin d'obtenir une bonne cicatrisation dans les meilleurs délais. L'utilisation de la crème à base de l'huile essentielle de *S.argel* pourrait présenter une solution efficace dans le traitement des brûlures chez les animaux.

Cas III : Efficacité de la crème à base de l'huile essentielle de *Solenostemma argel* sur des escarres chez un berger allemand atteint de dysplasie bilatérale des hanches

1. Introduction

Une escarre est une lésion ischémique induite par une compression localisée et prolongée, qui peut être associée ou non à un cisaillement. La majorité des escarres se développent en regard de proéminences osseuses, au niveau de la peau et des tissus sous-jacents (Nayak *et al.*, 2008). En clinique, on distingue deux types d'escarres, les escarres superficielles (stade 1 ou 2) et les escarres profondes (stade 3 ou 4) (NPUAP, 1998). Dans tous les cas, les escarres représentent une complication dangereuse, la prévention est donc de mise.

2. Présentation du cas

Rex est un berger allemand entier âgé de 10 ans, atteint d'une dysplasie bilatérale des hanches avec mobilité réduite. Il a été présenté en consultation suite à l'apparition de deux plaies sur le dos. Le chien vit en compagnie de deux autres chiens dans un jardin. Il reçoit une alimentation principalement à base de croquettes pour

chien adulte. Rex est correctement vacciné et vermifugé.

3. Examen clinique

L'examen clinique général a révélé un état cachectique avec une fonte musculaire considérable au niveau du dos et du train postérieur. Rex présente, également, des difficultés à se déplacer et à se tenir en équilibre en position debout. Deux escarres de décubitus de stade 4 ont été mises en évidence de part et d'autre de la colonne vertébrale au niveau lombaire avec perte complète de l'épaisseur de la peau et une destruction importante des tissus adipeux et musculaire sous-jacents entraînant une mise à nu de l'os (**Figure 83**). Ces escarres ont été occasionnées par un appui prolongé du chien en décubitus latéral sur le mur de sa niche. Par ailleurs, les constantes physiologiques de l'animal étaient normales.



Figure 83 : Escarres de décubitus chez le chien Rex.

IV. Examens complémentaires

Une radio du bassin a été réalisée afin de déterminer le stade d'évolution de la dysplasie bilatérale des hanches (**Figure 84**).



Figure 84 : Radiographie du bassin du chien Rex (Flèches blanches: Ostéophytes).

L'examen radiologique a révélé une dysplasie fémorale sévère de stade E caractérisée par un angle de Norberg-Olsson inférieur à 90° , une subluxation importante, une altération du cartilage au niveau des têtes fémorales et la présence de nombreux ostéophytes (**Figure 84**).

V. Traitement

Rex a été mis sous antibiothérapie de couverture à base de céfalexine à raison de 25 mg/kg deux fois par jour pendant 8 jours afin d'éviter les risques de complications infectieuses. Localement, les escarres ont été débridées afin d'enlever les poils et les tissus nécrosés puis nettoyées et désinfectées à l'aide de la polyvidone iodée. Par la suite, les escarres ont été traitées quotidiennement par la crème à base de 1% d'huile essentielle de *S.argel*. Une cicatrisation complète et rapide a été obtenue au

bout de 7 jours d'application (**Figure 85**).



Figure 85 : Cicatrisation complète des escarres de Rex avec repousse des poils.

VI. Conclusion

Les escarres sont fréquemment rencontrées chez les animaux à mobilité réduite, gravement malades ou très âgés. Leur prise en charge à temps est primordiale au risque de répercussions graves sur l'état de santé de l'animal avec engagement du pronostic vital. Grâce à ses effets anti-infectieux, cicatrisant, anti-inflammatoire et antioxydant, la crème SAHE 1% a permis une régénération tissulaire complète et rapide évitant ainsi l'installation de complications.

Cas IV : Efficacité de la crème à base d'huile essentielle de *Solenostemma argel* sur la cicatrisation d'un membre amputé chez une tortue terrestre

1. Introduction

L'amputation d'un membre est une thérapie drastique et doit être considérée comme un dernier recours dans le traitement des blessures aux membres. Toutes les autres options de traitement doivent être envisagées avant de prendre la décision d'amputer (St. Jean, 1996).

Il existe différentes causes pour l'amputation d'un membre, notamment, les lésions traumatiques des tissus mous (accident de la route, chute ou bagarre avec un autre animal), les fractures et les lésions nerveuses (St. Jean, 1996).

2. Présentation du cas

Il s'agit du cas d'une tortue terrestre retrouvée au niveau du jardin d'essai et présentée en consultation au niveau de la clinique vétérinaire du zoo pour un traumatisme au niveau de la patte arrière droite causé par une maltraitance. La tortue a été hospitalisée pour recevoir les soins nécessaires.

3. Examen clinique

L'examen clinique a révélé la présence d'une fracture ouverte au niveau du tibia et du péroné de la patte postérieure droite. Une nécrose a été mise en évidence sur une large étendue de la même patte. Par ailleurs, l'état général de la tortue était conservé.

4. Examens complémentaires

Aucun examen complémentaire n'a été réalisé

5. Traitement

La présence de tissus nécrosés de part et d'autre de la blessure sur une grande partie de la patte ainsi que la gravité de la fracture ouverte ont conduit l'équipe vétérinaire du zoo du jardin d'essai à l'établissement d'un traitement chirurgical reposant sur l'amputation de la patte postérieure droite au niveau de l'articulation coxo-fémorale (Figure 86).

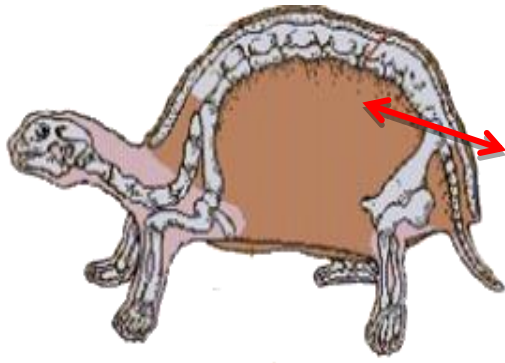


Figure 86 : Amputation du membre au niveau de l'articulation coxo-fémorale.

La tortue a été, par la suite, mise sous antibiothérapie de couverture à base de ceftiofur à raison de 2,2 mg/kg/24h pendant 10 jours. Elle a également reçu un traitement anti-inflammatoire à base de meloxicam à la dose de 0,2 mg/kg/24h pendant trois jours. Un traitement local a été également instauré sous forme d'une asepsie quotidienne par la polyvidone iodée suivi de l'application d'un topique à base de trolamine (Biafine®). La plaie a été par la suite recouverte par du tulle gras et un bandage. Ce traitement local a été maintenu pendant une période de deux mois sans amélioration constatée. Suite à cet échec de cicatrisation, un traitement

alternatif à base de la crème à 1% d'huile essentielle de *S. argel* a été appliqué quotidiennement pendant une période de 10 jours (**Figure 85**).



Figure 87 : Application de la crème SAHE 1% sur la plaie de la tortue

La crème SAHE 1% a entraîné une régénération tissulaire remarquable aboutissant au comblement du vide laissé par l'amputation à l'intérieur de la carapace (**Figure 87**). L'évolution dans le temps du processus de cicatrisation est représentée dans la **Figure 88**.

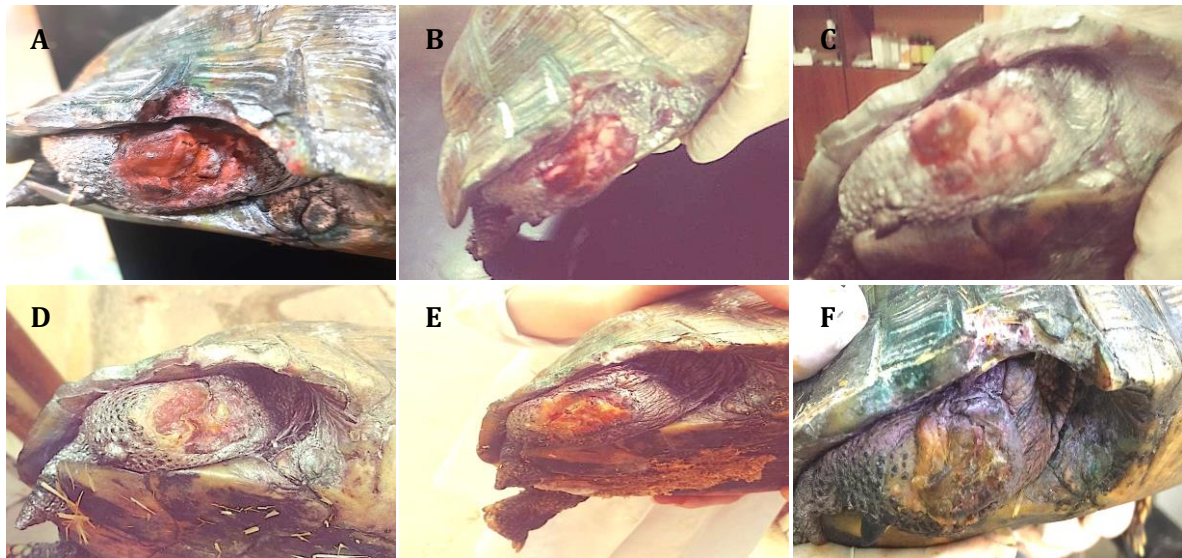


Figure 88 : Evolution dans le temps du processus de cicatrisation du moignon du membre amputé.

A: J0, **B:** J2, **C:** J4, **D:** J6, **E:** J8, **F:** J10.

6. Conclusion

Les amputations sont des pratiques assez courantes en médecine vétérinaire, de ce fait, l'utilisation d'un bon produit cicatrisant comme la crème SAHE 1% limiterait le risque de complications post-opératoire en favorisant une cicatrisation rapide et efficace sans être pour autant toxique.

Cas V : Efficacité de la crème à base de l'huile essentielle de *Solenostemma argel* sur une plaie d'automutilation chez un loup doré d'Afrique

1. Introduction

Les comportements anormaux chez les animaux en captivité sont généralement définis comme des comportements atypiques pour l'espèce et sont considérés comme des indicateurs du manque de bien-être (Jacobson *et al.*, 2016).

L'automutilation chez les animaux maintenus en captivité peut être déclenchée par plusieurs facteurs de stress spécifiques au confinement tels que les mouvements restreints, l'espace de retraite réduit, la proximité forcée avec les humains, les opportunités d'alimentation réduites, le maintien dans des groupes sociaux anormaux et d'autres restrictions d'opportunités comportementales sont prises en compte (Morgan et Tromborg, 2007).

2. Présentation du cas

Il s'agit du cas d'un loup doré d'Afrique adulte, capturé dans la forêt puis délivré au zoo du jardin d'essai. Le loup a été placé en quarantaine pendant une période de 15 jours afin d'éliminer tous les risques de contamination au moment de sa mise en cage avec ses congénères. Durant cette

période de quarantaine, le loup a présenté des signes d'automutilation au niveau de la queue, qui seraient la conséquence du stress lié au changement d'environnement et au passage de l'état libre à l'état de captivité.

3. Examen clinique

L'examen clinique a révélé un bon état général de l'animal avec des constantes physiologiques normales. Par ailleurs, des signes d'automutilation de la queue ont été mis en évidence avec installation d'une nécrose à l'extrémité postérieure de la queue et mise à nu des terminaisons nerveuses (Flèche rouge) (Figure 89).



Figure 89 : Automutilation de la queue chez un loup doré d'Afrique

4. Examens complémentaires

Aucun examen complémentaire n'a été effectué.

5. Traitement

Face à ce cas d'automutilation, l'équipe vétérinaire du zoo du jardin d'essai a opté pour la résection de l'extrémité postérieure nécrosée de la queue ainsi que les terminaisons nerveuses mises à nu. Le loup a reçu par la suite une couverture antibiotique à base de Cefotiofur à raison de 2,2 mg/kg/24h pendant 8 jours suivi de la Ciprofloxacine à la posologie de 5 mg/kg

deux fois par jour pendant 8 jours. Il a également reçu un traitement anti-inflammatoire à base de Meloxicam à la dose de 0,2 mg/kg/24h pendant trois jours. Comme traitement local, la crème à base de l'huile essentielle de *Solenostemma argel* (SAHE 1%) a été appliquée quotidiennement pendant 4 jours. La crème SAHE 1% a entraîné une cicatrisation complète de la queue avec repousse des poils en un temps record de 4 jours (**Figure 90**).

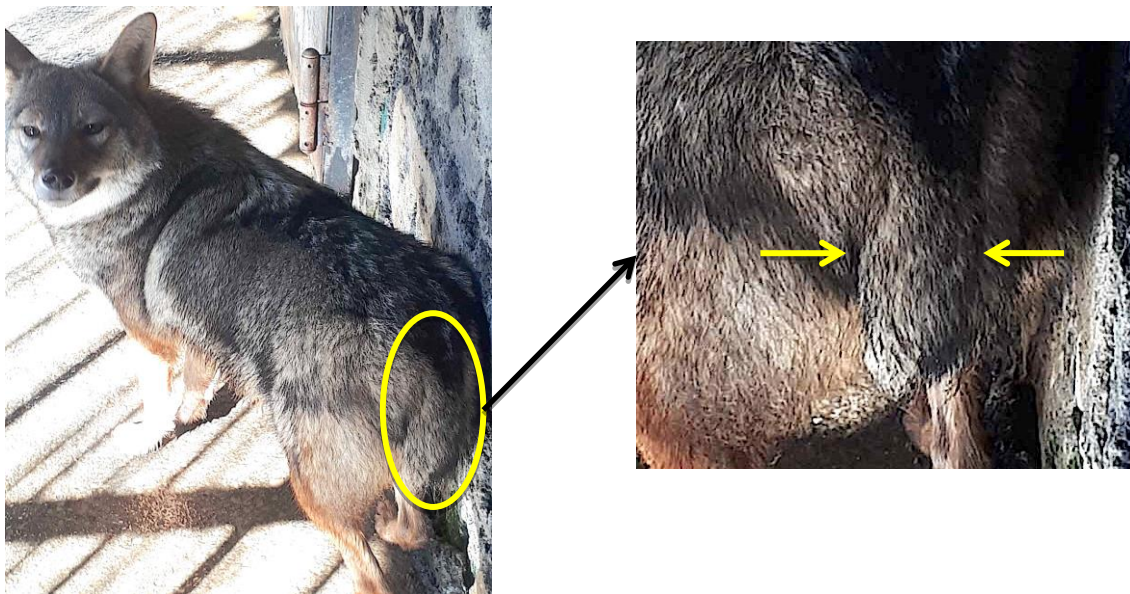


Figure 90 : Queue du loup doré d'Afrique après traitement par la crème SAHE 1%

6. Conclusion

L'automutilation est un phénomène souvent rencontré en médecine vétérinaire surtout parmi les animaux sauvages tenus

en captivité dans les zoos. La crème à base de l'huile essentielle de *S. argel* a permis une guérison rapide de la zone automutilée.

Cas VI : Efficacité de la crème à base d'huile essentielle de *Solenostemma argel* sur des plaies cutanées chez un couple de faisans

1. Introduction

La reproduction des oiseaux est un processus intéressant qui comporte plusieurs phases, telles que la parade nuptiale, la copulation, la construction du nid et ce jusqu'à l'éclosion des œufs. Au cours de la parade nuptiale, des combats entre mâles ainsi que des poursuites entre male et femelle sont souvent à l'origine de blessures chez les oiseaux [8].

2. Présentation du cas

Il s'agit du cas d'un couple de faisans du zoo du jardin d'essai d'El Hamma,

présentés en consultation pour des plaies cutanées apparues au cours de la phase nuptiale de la période de reproduction.

3. Examen clinique

L'examen clinique général est normal. L'examen clinique cutané a mis en évidence la présence d'une plaie cutanée assez profonde au niveau de la tête du faisan mâle suite à un combat spectaculaire entre mâles dominant et dominé (**Figure 91 (A)**). La femelle Faisan, quant à elle a présenté un large érythème avec perte de plumes au niveau de la tête et tout au long du cou (**Figure 91 (B)**).

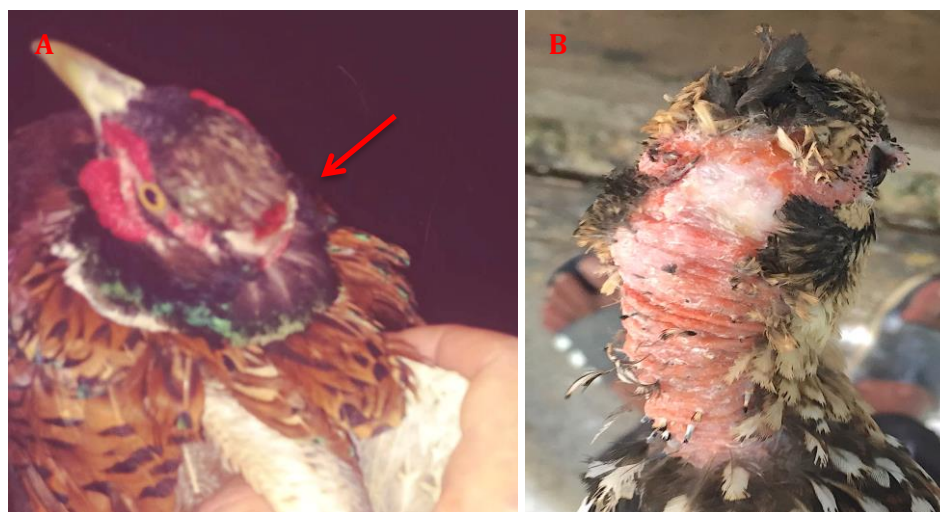


Figure 91 : Plaies cutanées chez un couple de faisan.
A : Faisan mâle, **B:** Faisan femelle.

4. Examens complémentaires

Aucun examen complémentaire n'a été effectué.

5. Traitement

Le couple de faisan a été traité localement par la crème à 1% d'huile essentielle de *S. argel* à raison d'une application par jour (**Figure 92**).

Une cicatrisation complète de la plaie du faisan mâle a été obtenue en 4 jours (**Figure 93 A**). Chez la femelle faisan, une disparition totale de l'érythème avec une repousse spectaculaire des plumes ont été

observées en seulement 3 jours de traitement (**Figure 93 B**).



Figure 92 : Traitement des plaies par la crème SAHE 1%

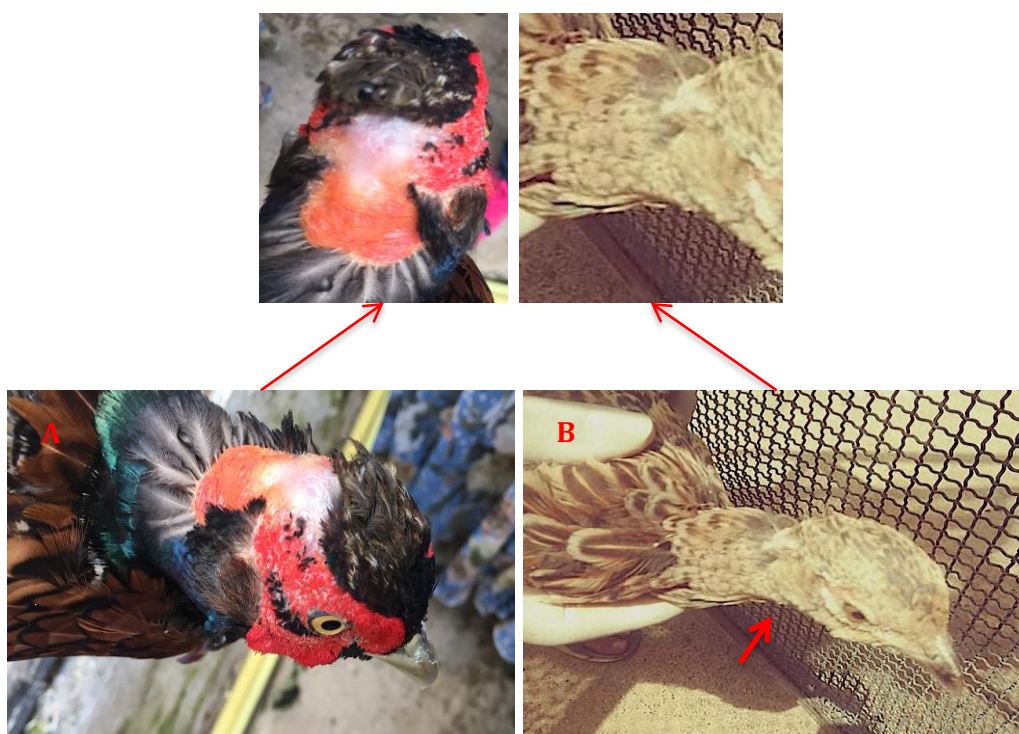


Figure 93 : Cicatrisation des plaies cutanées des faisans.
A: Faisan mâle, **B:** Faisan femelle.

6. Conclusion

Les plaies rencontrées suite à la parade nuptiale chez les oiseaux sont très fréquentes en consultations vétérinaires. L'utilisation de la crème SAHE 1% a permis l'obtention d'une cicatrisation rapide et efficace avec repousse des plumes.

CAS VII : Efficacité de la crème à base d'huile essentielle de *Solenostemma argel* sur des plaies d'été chez des chevaux

1. Introduction

Les plaies d'été aussi connues sous le nom d'habronémoses cutanées sont des helminthoses larvaires de la peau des équidés, non contagieuses, dues à la présence au niveau du tégument de larves L3 d'un des trois parasites *Habronema microstoma*, *Habronema muscae* ou *Habronema megastoma* (Clarín, 2006). Ces larves sont transmises par plusieurs variétés de muscides. L'habronérose cutanée est une pathologie à caractère récurrent (Figure 94). Elle évolue pendant les saisons chaudes (printemps et été). Elle est caractérisée par la présence de plaies prurigineuses, rebelles à la cicatrisation, d'aspect granuleux et bourgeonnant (Bourdoiseau et Pin, 2018).

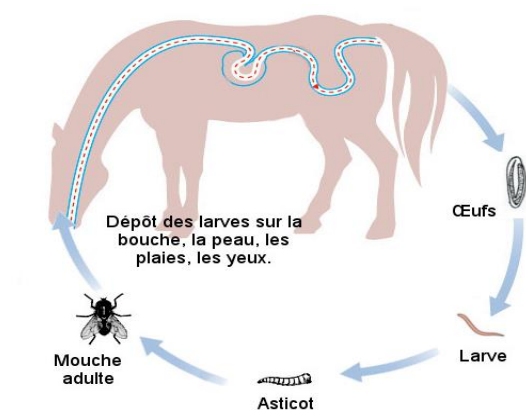


Figure 94 : Cycle évolutif de l'habronérose [9]

2. Présentation des cas

Il s'agit du cas de deux juments présentées en consultation pour des plaies récidivantes au niveau des membres. La première jument nommée Nedjma est de race « Persane », âgée de 7 ans, ayant une robe gris clair. La deuxième jument Elza est de race croisée « Persan-barbe » de couleur noire âgée de 6 ans. Ces juments vivent toutes les deux dans la même écurie.

3. Examen clinique

L'examen clinique général n'a révélé aucune anomalie. Cependant, l'examen clinique cutané a permis de mettre en évidence la présence d'habronérose cutanée chez les deux juments à différentes phases d'évolution. La première jument Nedjma présentait une plaie d'été au stade de début, au niveau de la face interne du boulet du membre antérieur gauche. Cette plaie était à l'origine d'un prurit important qui a conduit la jument à se mordre et à s'automutiler (Figure 95 (A)). La seconde jument Elza présentait, une plaie d'été au stade d'état, au niveau de la face externe du boulet du membre antérieur droit. Cette

plaie était recouverte de bourgeons charnus séparés par des sillons dans lesquels se trouvaient des granulations et était

entourée d'un bourrelet épidermique périphérique (**Figure 95 (B)**).



Figure 95 : Plaies d'été chez les juments Nedjma (A) et Elza (B)

4. Examens complémentaires

Aucun examen complémentaire n'a été effectué.

5. Traitement

Les plaies des juments Nedjma et Elza ont été nettoyées et désinfectées puis traitées quotidiennement par la crème à 1% de l'huile essentielle de *S. argel*. La mesure des surfaces des plaies a été réalisée à l'aide du logiciel AutoCad selon le planning suivant: J0, J2, J4, J6, J8, J10, J12, J14, les résultats sont représentés dans la **Figure 96**. L'évolution dans le temps des plaies est représentée par des photos prises selon le planning mentionné sur les **Figures 97 et 98**.

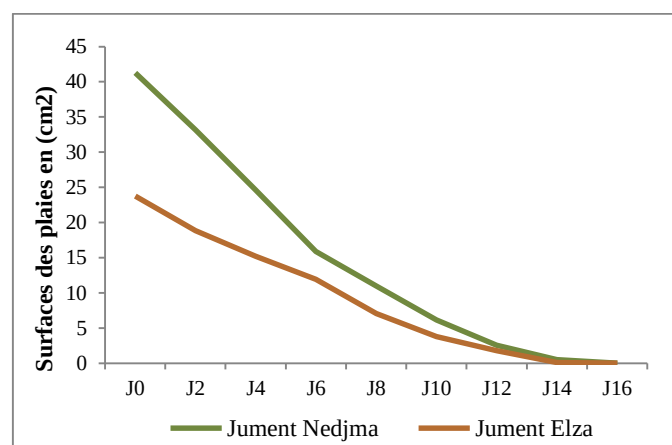


Figure 96 : Evolution dans le temps des surfaces des plaies traitées par SAHE 1%

6. Conclusion

La crème à base de l'huile essentielle de *S. argel* a permis une cicatrisation complète des plaies d'été des deux juments traitées et pourrait représenter un moyen efficace dans le traitement des plaies d'été en association avec un déparasitage interne régulier des chevaux.

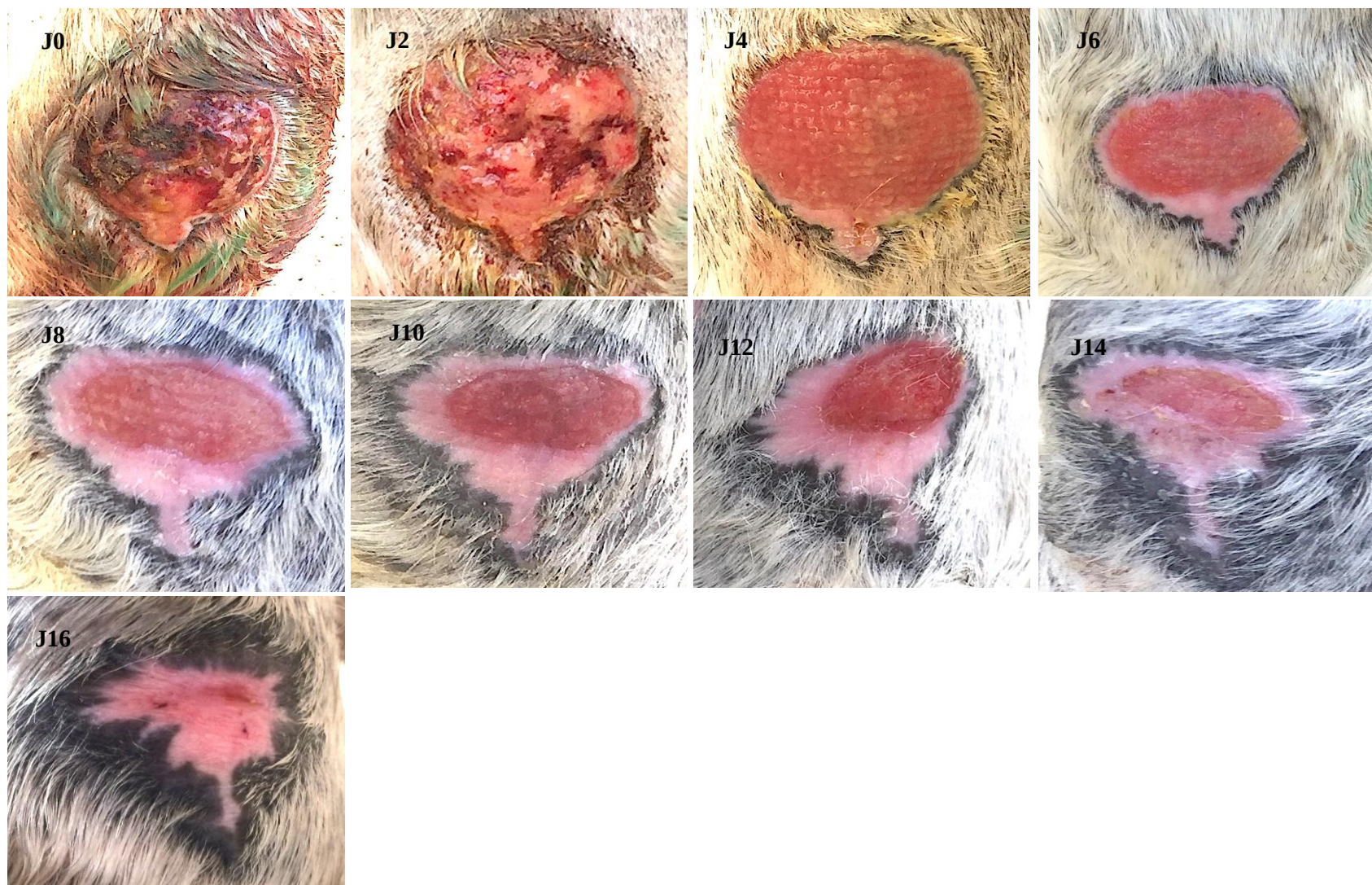


Figure 97 : Evolution en photos de la plaie d'été de la jument Nedjma après traitement par la crème à l'huile essentielle de *S.argel* (SAHE 1%.)



Figure 98 : Evolution en photos de la plaie d'été de la jument Elza après traitement par la crème à l'huile esentielle de *S.argel* (SAHE 1%).

Cas VIII : Désinfestation par l'extrait aqueux de *Solenostemma argel* d'un bâtiment d'aquaculture envahi par les puces *Ctenocephalides felis*

1. Introduction

Ctenocephalides felis (Bouché, 1835) est une espèce euryxène d'importance médico-vétérinaire. C'est la puce la plus répandue à travers le monde. Elle est responsable de troubles dermatologiques considérables chez les animaux domestiques. La puce du chat est également un vecteur de deux genres de pathogènes zoonotiques *Bartonella* et *Rickettsia* ainsi que l'hôte intermédiaire du ténia *Dipylidium caninum* (Franc et al., 2013).

2. Présentation du cas

Le chalet bleu du jardin d'essai a été récemment transformé en bâtiment d'aquaculture dans le but de développer l'élevage des espèces de poissons existantes (Figure 99). En début d'été, le chalet a été envahi par des rats. Une opération de dératisation s'en est suivie aboutissant à la mort de ces derniers. Suite à cela, les puces qui infestaient le corps des rats se sont propagées dans l'ensemble du bâtiment d'aquaculture à la recherche d'autres biotopes propices à leur survie.

Plusieurs employés du chalet bleu ont été contaminés.



Figure 99 : Chalet bleu du jardin d'essai

3. Examens complémentaires

Des prélèvements ont été effectués au niveau de ce bâtiment afin d'identifier l'espèce de puce en cause. L'examen direct à la loupe et au microscope optique (4x, Motic BA310, MoticEurope, Germany) des puces récoltées a permis l'identification de l'espèce *Ctenocephalides felis*, en mettant en évidence les principaux critères de diagnose pour cette espèce à savoir une

capsule céphalique allongée, deux premières épines de la cténidie génale de longueur équivalente et six encoches à la face externe des tibias (**Figure 100**) d'après les clés dichotomiques de l'ordre

des *Siphonaptera* et du genre *Ctenocephalides* décrites par **Beaucournu et Launay (1990)**, **Beaucournu et Menier (1998)** et **Duchemin et Bitam (2017)**.

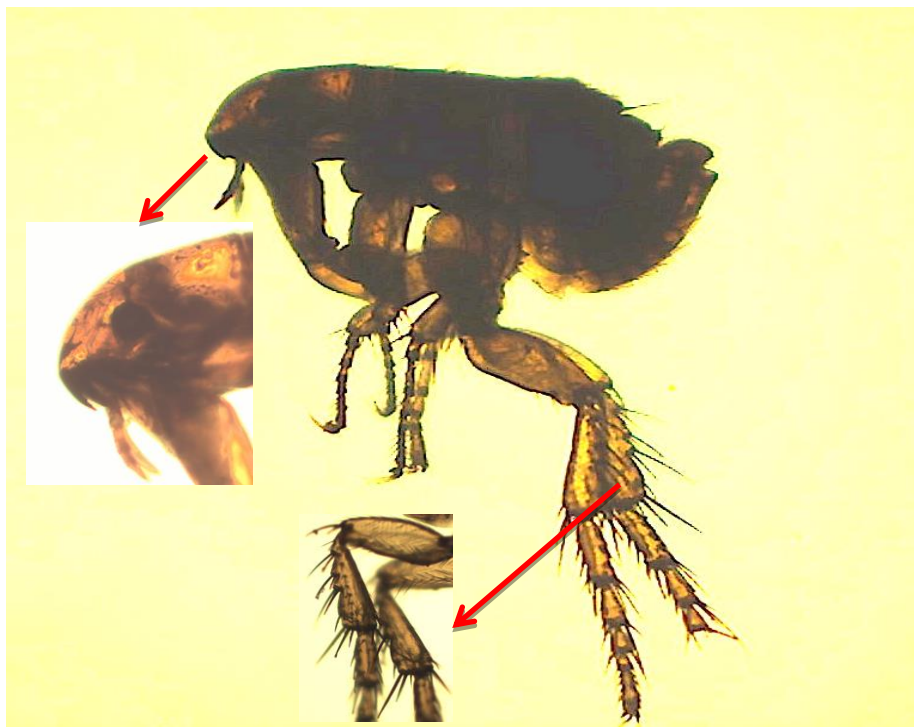


Figure 100 : Diagnose de la puce *ctenocephalides felis* prélevée au sein du bâtiment d'aquaculture (photos réelles prises au microscope optique Gx4).

4. Traitement

Afin de lutter contre la propagation de la puce *ctenocephalides felis* dans le chalet bleu du jardin d'essai, une solution aqueuse à 4% de *S. argel* a été pulvérisée sur l'ensemble du bâtiment. L'extrait aqueux de *S.argel* a permis une élimination radicale de la puce *ctenocephalides felis* du bâtiment d'aquaculture en une seule application.

5. Conclusion

Les désagréments causés par les puces font fréquemment l'objet de consultation vétérinaire et représentent la majorité des causes de pathologies rencontrées en dermatologie vétérinaire. L'utilisation de la solution aqueuse à base de *S. argel* est un moyen efficace et non toxique de lutte contre l'infestation par les puces.

Essais Cliniques

Essai Clinique I

Efficacité de l'extrait aqueux de *Solenostemma argel* sur l'ectoparasitose à *Dermanyssus gallinae* chez des perruches ondulées (*Melopsittacus undulatus*)

I. Introduction

Dermanyssus gallinae, appelé aussi « faux pou ou pou rouge des volailles », est un acarien parasite hématophage aviaire à activité nocturne. Son réservoir est habituellement les nids de divers oiseaux, les volières et les poulaillers (**Magdoud et al., 2019**). Le caractère zoonotique de ce parasite doit être pris en considération dans la mesure où lorsque son hôte habituel n'est pas disponible, *D. gallinae* peut infester d'autres hôtes, notamment, les chiens, les chats, les lapins, les chevaux y compris l'homme (**Dogramaci et al., 2009**). *D. gallinae* peut être à l'origine de grandes pertes économiques d'où l'importance de la mise en évidence de nouveaux traitements efficaces et non toxiques pour les animaux. En effet, l'augmentation du taux de résistance aux acaricides utilisés contre ce parasite limite leur efficacité (**Dcru et al., 2020**).

2. Présentation du cas

Il s'agit du cas d'une volière au sein du zoo du jardin d'essai abritant 45 perruches ondulées (26 femelles et 19 mâles) (**Figure**

101), chez lesquelles des signes de prurit ont été signalés par le personnel soignant du zoo. Par ailleurs, l'état sanitaire de la volière était insalubre par la présence d'excréments sur le sol et dans l'eau de boisson des oiseaux.

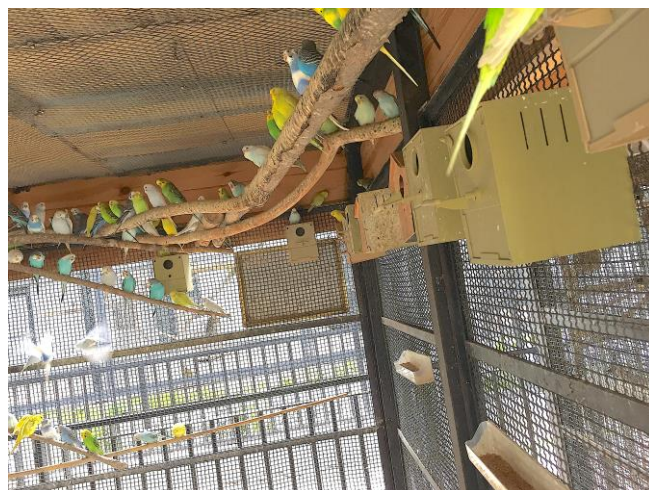


Figure 101 : Volière des perruches ondulées du zoo du jardin d'essai

3. Examen clinique

L'examen clinique a permis de mettre en évidence la présence de signes de prurit ainsi que des squames sur l'ensemble de la peau des perruches ondulées et en plus grande quantité sous leurs ailes. Des plaies dus au picage des plumes, au stress et à l'agitation chez les oiseaux ont été

également mises en évidence. De plus, l'inspection des nids a révélé la présence de ténébrions sur leurs surfaces externes (**Figure 102**).



Figure 102 : Ténébrions retrouvées sur les nids des perruches ondulées *Melopsittacus undulatus*.

Ces derniers ont été identifiés par Pr Marniche (Laboratoire de Zoologie de l'ENSV) comme étant des *Tenebrionidae* *Alphitobius diaperinus* (5,5-6 mm) (**Panz, 1797**) (**Figure 103**).

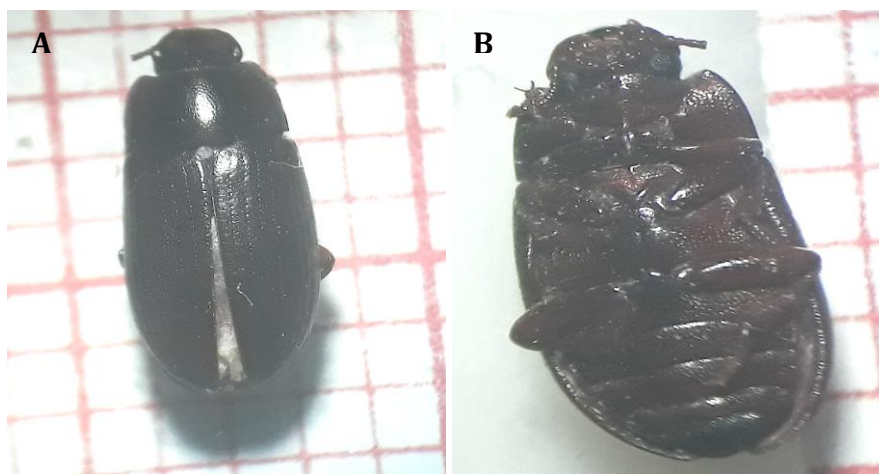


Figure 103 : Ténébrions *Alphitobius diaperinus* (5,5-6 mm).
A: Face dorsale, B: Face ventrale.

4. Examens complémentaires

Des prélèvements ont été effectués sous forme de raclages sur les perruches ondulées dans le but de récolter des squames. Des plumes ont été également prélevées. Des échantillons ont été aussi récoltés au niveau de la volière et des nids. Les prélèvements ont été, par la suite, colorés au bleu de lactophénol et observés au microscope optique (Gx10) L'examen direct a révélé la présence de l'acarien *Darmanyssus gallinae* gorgé de sang, caractérisé par des chélicères styloformes, de longues pattes et un bouclier dorsal se rétrécissant à l'arrière (**Sparagano et Giangaspero, 2011**) ainsi que des levures *Malassezia spp* ; tous deux en très grand nombre par champ (**Figure 104**). La présence des levures *Malassezia* est le signe d'une surinfection fongique probablement due à l'affaiblissement des défenses immunitaires (**Hobi et al., 2022**).

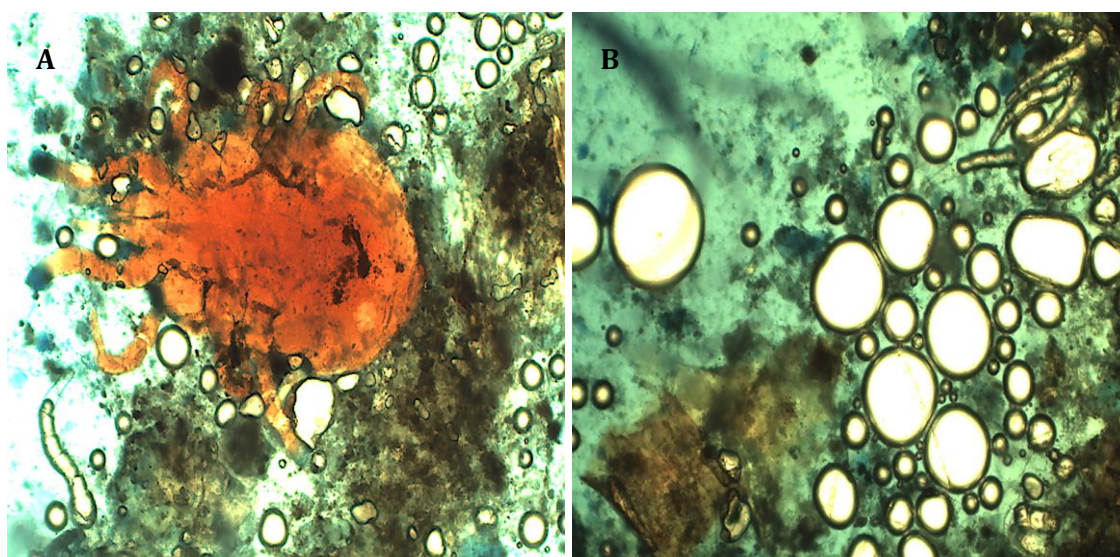


Figure 104 : Microphotographie de *Dermanyssus gallinae* et *Malassezia Spp* prélevés à partir des perruches ondulées.

A: *Dermanyssus gallinae* Gx10, **B:** *Malassezia Spp* Gx10.

5. Traitement

Afin d'éliminer l'acarien suceur de sang *Dermanyssus gallinae*, les perruches ondulées ont été aspergées par une solution aqueuse à 2% de *S. argel* sur l'ensemble du corps quotidiennement pendant une semaine. La volière ainsi que les nids ont été désinfectés par l'extrait aqueux de *S. argel*. Une nette amélioration a été constatée dès la première application.

Au septième jour, des prélèvements ont été effectués sur les perruches et dans la

volière et les nids afin de vérifier l'efficacité du traitement. L'examen direct des prélèvements au microscope optique a révélé une disparition totale de *Dermanyssus gallinae* sur les perruches (**Figure 105 A, B, C**) et dans la volière et les nids (**Figure 105, D**). Par ailleurs, des levures *Malassezia* commensales ont été retrouvées en petit nombre sur les perruches ondulées (**Figure 103, C**). L'extrait aqueux de *S. argel* a permis également l'élimination des ténébrions *Alphitobius diaperinus* retrouvés sur les nids.

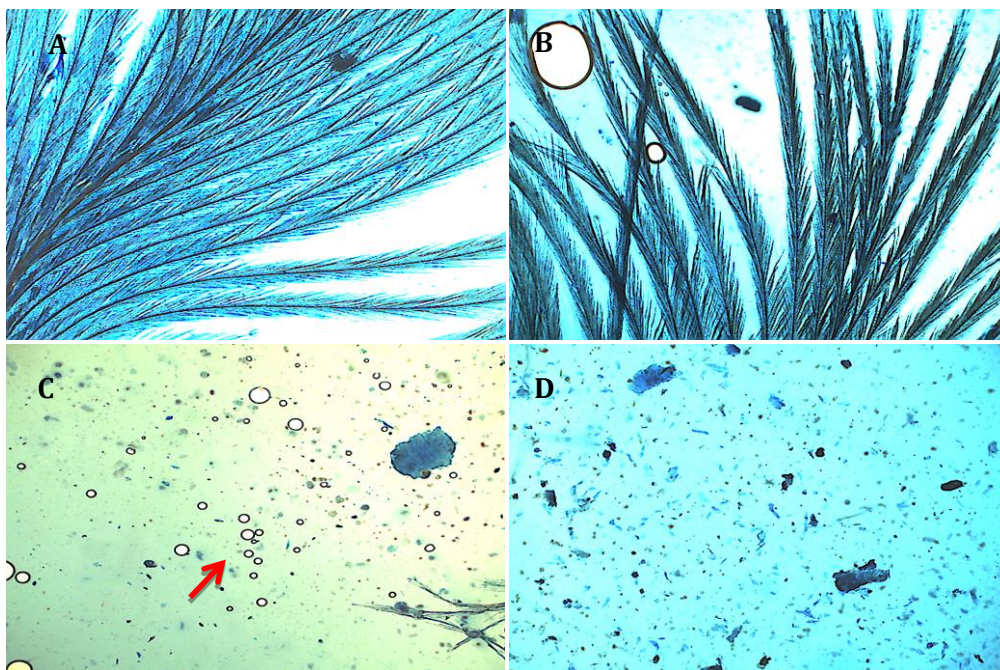


Figure 105 : Micrographies des prélèvements réalisés après traitement par l'extrait aqueux de *S.argel*.

A, B, C : Prélèvements à partir des perruches ondulées x4, **D:** Prélèvement à partir de la volière et des nids x4. **Flèche rouge:** Levures *Malassezia*

Les résultats de nos travaux ont été consignés dans un article original intitulé « Effectiveness of *Solenostemma argel* extract on *Dermanyssus gallinae* in budgies (*Melopsittacus undulatus*) » dans la revue World's Veterinary Journal, en 2023

6. Discussion

Le *D. gallinae* est une espèce cosmopolite, l'acarien *Dermanyssidae* le plus commun, qui parasite un large éventail d'hôtes (**Mullen et Oconnor, 2019**). Cet acarien constitue une menace majeure pour l'industrie avicole et l'élevage d'oiseaux d'ornement dans le monde entier, entraînant des pertes économiques et de graves problèmes de santé animale (**Decru et al., 2020**). Le *D. gallinae* est un parasite d'importance majeure tant en médecine

vétérinaire qu'en médecine humaine dans la mesure où il joue un rôle de vecteur de plusieurs pathogènes, notamment les bactéries *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Coxiella burnetii*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Borrelia burgdorferi* et *Salmonella enteritidis* ainsi que le virus de la grippe aviaire A, le virus de Newcastle et le virus de l'encéphalomyélite équine (**Valiente et al., 2007 ; Sparagano et Giangaspero, 2011 ; George et al., 2015 ;**

Sommer et al., 2016 ; Sigognault Flochlay et al., 2017).

La prévalence croissante de l'infestation par les acariens *D. gallinae* dans le monde est un sujet de préoccupation et peut être attribuée à plusieurs facteurs. Ceux-ci incluent la transformation des systèmes de logement en installations d'élevage aviaire, le non-respect des bonnes pratiques de gestion des volières, le réchauffement climatique et le manque de méthodes efficaces pour contrôler les infestations, ainsi que la résistance croissante des acariens aux acaricides couramment utilisés tels que les carbamates et les pyréthrinoïdes (**Sparagano et Giangaspero, 2011; Sigognault Flochlay et al., 2017**). De plus, une pénurie d'acaricides efficaces a été signalée, plusieurs traitements chimiques ayant été retirés du marché en raison de leurs effets néfastes sur l'homme, ce qui limite les options disponibles pour contrôler les infestations d'acariens (**Abbas et al., 2014 ; Sigognault Flochlay et al., 2017**). En Europe, très peu de produits sont autorisés contre *D. gallinae*, à l'exception d'un produit à base de phoxime récemment approuvé, qui ne peut être utilisé que lorsque le poulailler est vide, c'est-à-dire entre deux cycles de production (**Sparagano and Giangaspero, 2011**).

Le présent cas clinique a démontré l'efficacité de l'extrait aqueux de *S. argel* sur des perruches *M. undulatus* infestées par

l'acarien *D. gallinae*. L'extrait a également permis l'élimination du pou rouge des nids et de la volière. Plusieurs études ont mis en évidence la composition phytochimique de *S. argel* (**Tigani et Ahmed, 2009; Shafek et Michael, 2012; Benmaarouf et al., 2020**). En effet, les principaux constituants des extraits de feuilles de *S. argel* sont les flavonoïdes (rutine, quercétine, kaempférol (**Cen-Pacheco et al., 2020**), les alcaloïdes (**Wu et al., 2021**), les tanins (**Fernández-Salas et al., 2011**) et les saponines (**Pavela, 2016 ; Teia, 2018**), ces derniers sont connus pour leurs effets antibiotiques et acaricides. Les extraits de *S. argel* représentent donc des candidats intéressants dans la lutte contre l'acarien hématophage *D.gallinae*. L'effet insecticide des extraits de *S. argel* a déjà été décrit sur *Tribolium castaneum* (**Gipreel et al., 2020**) ou *Culex pipiens* (**Al-Mekhlafi et al., 2018**). Plusieurs études récentes ont mis en évidence les effets acaricides des produits à base de plantes contre *D. gallinae*. Les études réalisées précédemment ont démontré l'efficacité de 50 huiles essentielles de plantes (comme l'ail, le thymus ou l'arbre à thé) sur les acariens rouges avec des taux de mortalité allant de 80 à 100 % (**George et al., 2009 ; George et al., 2010**). Une autre étude a démontré une activité acaricide significative des huiles essentielles de cade, de clou de girofle, de moutarde, de laurier, de coriandre, de menthe pouliot, de thym

rouge et blanc, de cannelle et de menthe verte contre *D. gallinae* en utilisant des méthodes de contact direct et de fumigation **(Kim et al., 2004)**.

Néanmoins, des conditions sanitaires favorables sont nécessaires pour garantir l'efficacité des différents médicaments et extraits contre le pou rouge. L'extrait

aqueux de feuilles de *S. argel* semble avoir un effet sur la réduction des levures *Malassezia*, indiquant ainsi un effet antifongique. Ceci est en accord avec une étude précédente montrant un effet antifongique sur *Candida albicans* **(Farah and Ahmed, 2016)**.

7. Conclusion

L'extrait aqueux de *S. argel* a permis une élimination totale de l'acarien suceur de sang et agent de zoonose *Dermanyssus gallinae*. La solution aqueuse de *S. argel* représente, par conséquence, un moyen de lutte efficace et non toxique contre cet ectoparasite.

Essai clinique II

Efficacité de l'extrait aqueux de *Solenostemma argel* sur une ectoparasitose à *Lernaea cyprinacea* chez des poissons *Xiphophorus hellerii*

1. Introduction

Xiphophorus helleri est une espèce de poisson d'eau douce originaire d'Amérique centrale. Les *xiphophorus helleri* sont des poissons omnivores et grégaires vivant en petits groupes. Leur mode de reproduction est ovovivipare et les males sont polygames (**Chevoleau, 2006**). L'un des parasites externes fréquemment rencontrés chez plusieurs espèces de poissons d'ornement d'eau douce est *Lernaea cyprinacea* (**Kumaraguru et al., 2006**). Le cycle de vie de *L. cyprinacea* est composé de trois stades nauplii libres et de cinq stades copépodides (**Waicheim et al., 2019**). Après l'accouplement des femelles et des mâles cyclopoïdes, les femelles s'attachent à leur hôte et subissent une métamorphose tandis que les mâles meurent (**Avenant-Oldewage 2012 ; Waicheim et al., 2019**). Une fois attachée au poisson, *L. cyprinacea* se nourrit de débris de tissus et de sang (**Urku et Onalan ,2018**).

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillonnage

Les poissons de l'espèce *xiphophorus hellerii* présentant des parasites sur la peau ont été prélevés d'un bassin naturel au sein du jardin d'Essai. Ces poissons sont élevés dans des bassins naturels alimentés de l'eau de source du jardin. Aucun changement dans leur alimentation et leur mobilité n'a été signalé.

2.2. Examen clinique

L'examen clinique général a été effectué dans le but de mettre en évidence les lésions macroscopiques ainsi que les symptômes générés par le parasite.

2.3. Examens complémentaires

Des prélèvements ont été effectués sur les *xiphophorus helleri* dans le but d'identifier le genre du parasite en cause par microscopie optique (Motic AB310, Germany). Dans le but d'identifier l'espèce de ce parasite, ce dernier a été clarifié dans de l'hydroxyde de potassium

à 10% pendant 48h puis fixé dans une série de bacs d'alcool à 70% et 90%, respectivement. Par la suite, le parasite a été monté sur lame dans de la turpentine puis séché à 50°C (**Matile 1993**).

2.4. Analyse des paramètres de l'eau

D'autre part, les mesures des paramètres physicochimiques de l'eau ont été réalisées sur les trois aquariums mis en expérimentation (Témoin, standard et test), à l'aide d'un appareil multiparamétrique. La mesure des paramètres suivants a été réalisée, température (T°C), pH, salinité, conductivité (EC), TDS (Total Dissolved Solids), density relative (SG) and potential redox (ORP).

3. Traitement

Le schéma thérapeutique a reposé sur l'aménagement de trois aquariums hôpitaux remplis d'eau de source du jardin et composé chacun de 25 poissons *xiphophorus helleri* parasités (**Figure 106**).

Le premier est un aquarium témoin n'ayant reçu aucun traitement. Le second aquarium traité par un antiparasitaire standard le praziquantel (Droncit®) et le troisième est un aquarium traité par l'extrait aqueux de *Solenostemma argel* avec une concentration de départ de 4% pendant 2h puis l'ensemble est dilué de moitié pour passer à une concentration de 2% pendant 24h

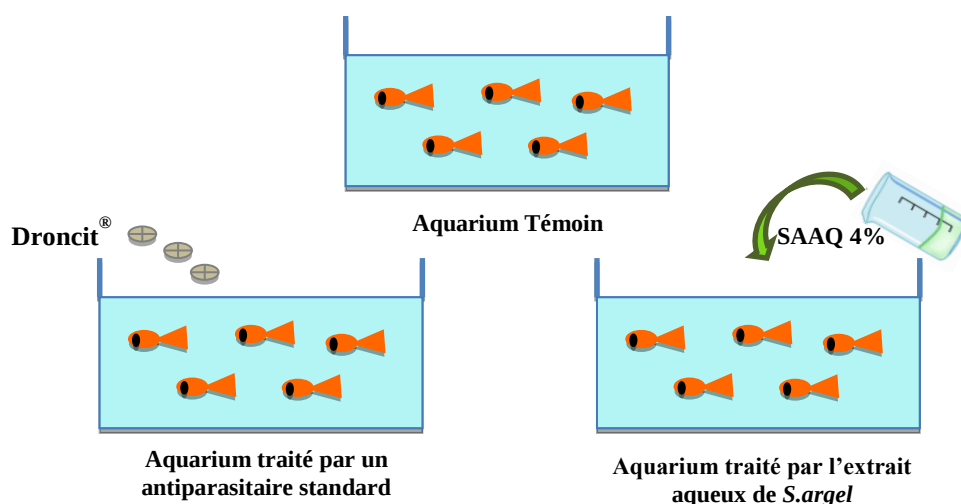


Figure 106 : Représentation schématique des aquariums hôpitaux mis en expérimentation (schéma thérapeutique)

4. Etude anatomopathologique

Au terme de l'expérimentation, trois poissons de chaque aquarium ont fait l'objet d'un examen histopathologique. Les échantillons ont été fixés dans du formol à 10% puis déshydratés et enrobés à la paraffine pour former des blocs. Des sections de 5 µm ont été coupées puis colorées à l'hématoxyline/éosine (**Ramalingam et al, 2023**). Les lames obtenues ont été observées au microscope optique (Leica DMLS2.11501200, Caméra Leica MC170HD) afin de mettre en évidence les lésions microscopiques induites par le parasite.

5. Résultats

5.1. Examen clinique

L'examen clinique général des *xiphophorus hellerii* a révélé un bon état général des poissons. L'examen cutané a permis de mettre en évidence un ectoparasite fixé sur la peau en nombre varié d'un poisson à un autre et la présence de mucus en excès sur la surface de la peau (**Figure 107**).

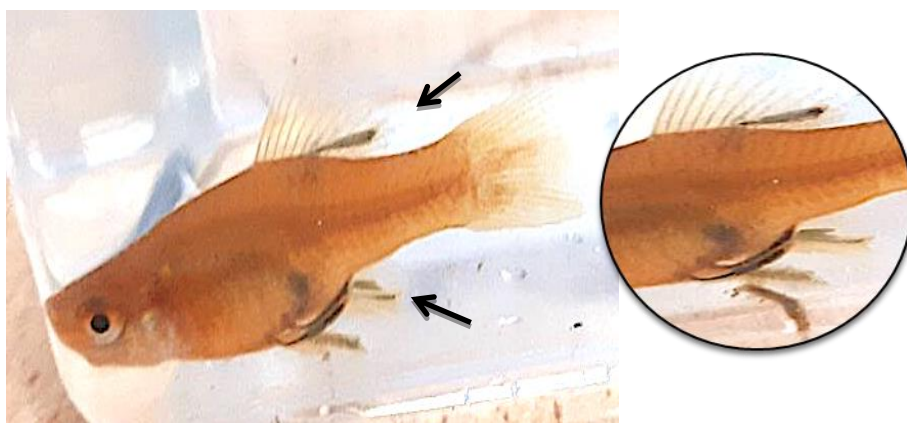


Figure 107 : *Xiphophorus hellerii* paarasité (Photo personnelle)

5.2. Identification de l'ectoparasite

L'examen direct au microscope optique a permis d'identifier un parasite macroscopique du genre *Lernaea* (**Figures 108 et 109**). L'identification de l'espèce a été confirmée par Pr F. Marniche (Laboratoire de Zoologie, ENSV), comme étant *Lernaea cyprinacea*.

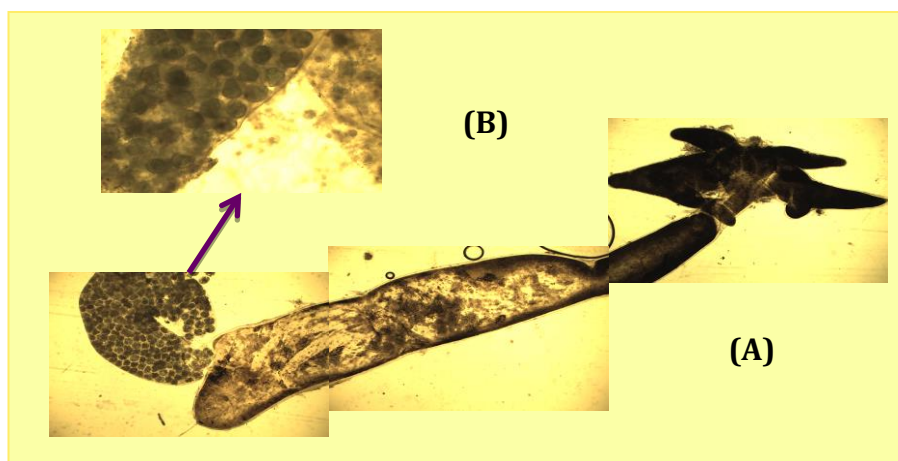


Figure 108 : *Lernaean cyprinacea* (Photos réelles).
(A): *Lernaean cyprinacea*, (B): Sac ovarien avec œufs.



Figure 109 : *Lernaean cyprinacea* (A : Mx12 ; B: Mx10)

5.3. Effet sur les paramètres de l'eau

La qualité de l'eau des aquariums mis en expérimentation a été évaluée en mesurant plusieurs indicateurs physicochimiques à l'aide d'un appareil multiparamétrique. Les paramètres mesurés sont la température ($T^{\circ}\text{C}$), le pH, la salinité, la conductivité (EC), le TDS (Total Dissolved Solids), la densité relative (SG) et le potentiel redox (ORP). L'ajout de l'extrait aqueux de *S. argel* à l'eau contenue dans l'aquarium a entraîné une diminution du pH ($p < 0,082$; $p < 0,046$), de la salinité ($p < 0,025$) et de la conductivité ($p < 0,036$; $p < 0,046$) de l'eau ainsi que du total des matières dissoutes ($p < 0,0002$) par rapport aux aquariums témoin et le standard Praziquantel, respectivement (**Tableau 34**). Aucune différence significative n'a été enregistrée pour les autres paramètres.

Tableau 34 : Effet de l'extrait aqueux de *S. argel* sur les paramètres physicochimiques de l'eau des aquariums expérimentaux

	Témoin	Praziquantel	SAAQ
T (°C)	22±0 ^a	22±0 ^a	22±0 ^a
pH	6.72±0,029 ^a	6.74±0,032 ^a	6.64±0.032 ^b
Salinité (%)	0.12±0 ^a	0.12±0 ^a	0.06±0 ^b
SG	1±0 ^a	1±0 ^a	1±0 ^a
EC (µS/cm)	2540±0 ^a	2530±17,32 ^a	1253±9.54 ^b
TDS (ppm)	1281±18,25 ^a	1291.7±2,52 ^a	642.7±16.25 ^b
ORP (mV)	174.67±0,58 ^a	171.67±1,53 ^a	174.66±0.58 ^a

5.4. Effet sur le parasite *Lernaea cyprinacea*

Le traitement des *xiphophorus helleri* par l'extrait aqueux de *S.argel* a entraîné l'élimination des parasites *Lernaea cyprinacea*. L'examen direct au microscope optique du parasite après traitement par la solution aqueuse de *S.argel* a permis de mettre en évidence le parasite *Lernaea cyprinacea* en état de décomposition (**Figure 110**), ainsi que la disparition des œufs reflétant la non viabilité de ces derniers (**Figure 110**). De la même façon, le traitement antiparasitaire standard Droncit[®] (Praziquantel) a entraîné la mort des parasites.

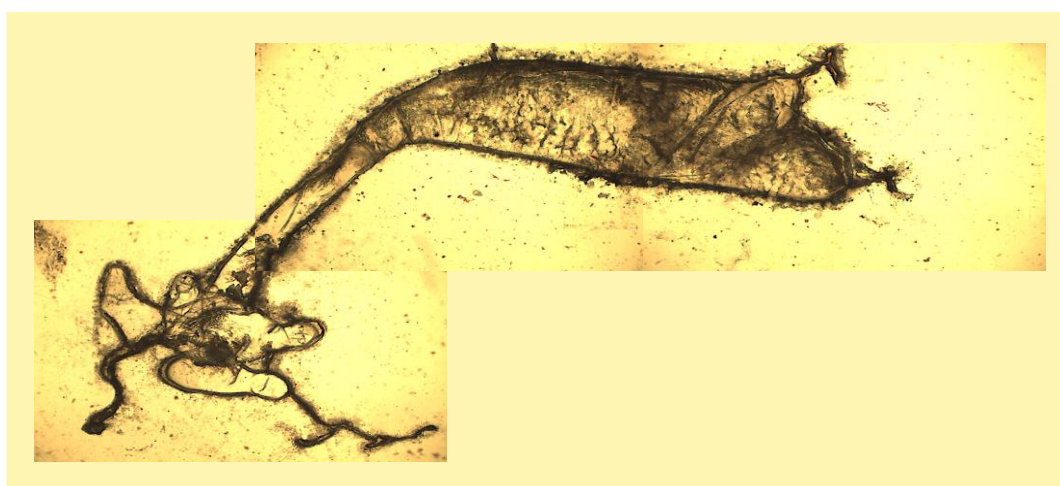


Figure 110 : *Lernaea cyprinacea* décomposé après traitement par l'extrait aqueux de *Solenostemma argel* (Photo personnelle).

5.5. Etude anatomopathologique

L'analyse des lésions histopathologiques s'oriente vers les zones d'ancrage du parasite *L. cyprinacea* au niveau des régions abdominales, caudales et dorsales de *X. hellerii* principalement au niveau des nageoires, de la peau et de l'œil.

Les lésions retrouvées dans tous les prélèvements sont caractérisées par la présence de mucus associé ou non à un œdème. Les coupes histologiques réalisées à partir des échantillons du groupe témoin sont caractérisées par la présence de *Lernaea cyprinacea* ancrée dans le muscle (**Figure 111 (B)**) ; contrairement aux groupes praziquantel et SAAQ dans lesquels seule la morsure du parasite est mise en évidence (**Figure 111 (C), (D)**).

De plus, dans tous les échantillons, des foyers d'impregnation calcique sont présents à proximité des points d'ancrage du parasite dans la peau et les yeux (**Figure 111 (A), (C), (D)**). De plus, il existe des foyers inflammatoires de type infiltrats mononuclés, observés dans les régions intramusculaires profondes ou, plus rarement, sous-cutanées (**Figure 111 (E)**). Enfin, une dégénérescence musculaire a été constatée dans certaines zones (**Figure 111 (A), (C), (D), (F)**).

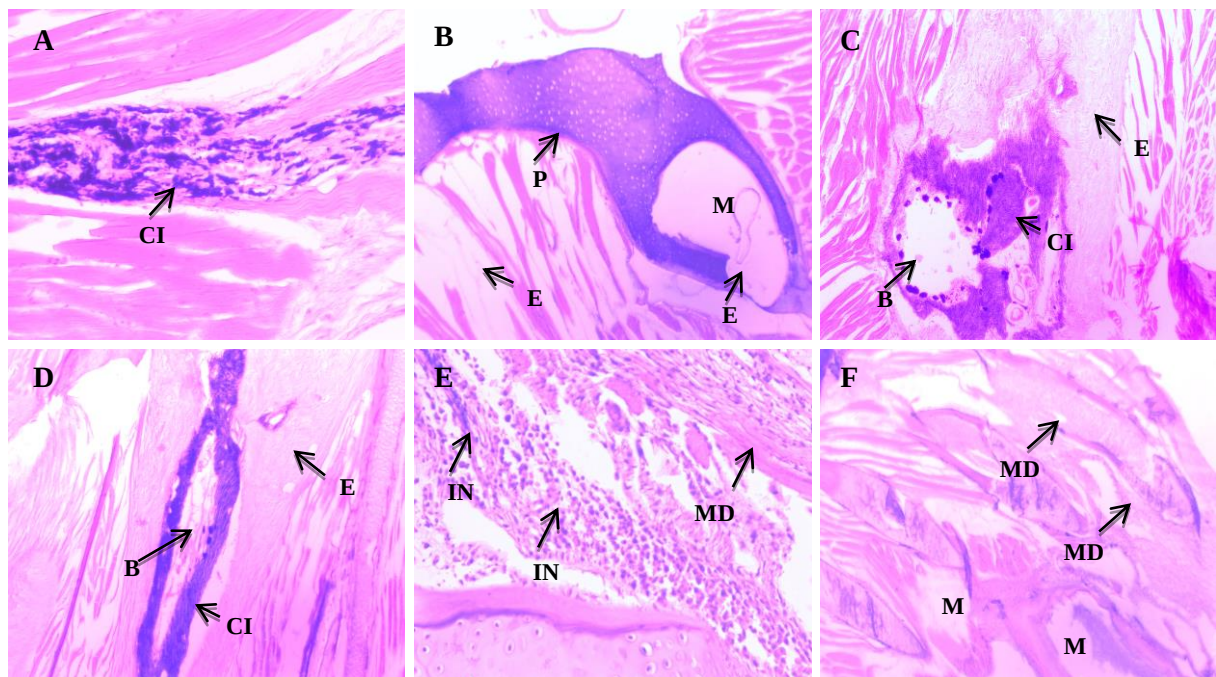


Figure 111 : Iconographies des *Xiphophorus hellerii* parasités par *Lernaea cyprinacea*, colorées avec l'hématoxyline et l'éosine.

A: Témoin x10; **B:** Témoin x4; **C:** Praziquantel x4; **D:** SAAQ x4; **E:** Inflammation à cellules mononuclées présente dans tous les groupes x4; **F:** Dégénérescence musculaire x4. **P:** Parasite, **CI:** Impregnation Calcique, **E:** Oedème, **M:** Mucus, **B:** Morsure, **IN:** Inflammation, **MD:** Dégénérescence Musculaire.

6. Discussion

L'intensification de la pisciculture est l'un des obstacles sanitaires majeurs à l'origine de l'apparition d'infestations parasitaires entraînant une mortalité et une baisse de productivité conduisant à des pertes économiques importantes (Valladao *et al.*, 2014). *Lernaea cyprinacea* est un crustacé copépode à répartition cosmopolite (Waicheim *et al.*, 2019; Barros *et al.*, 2021), communément appelé ver ancre (Kupferbeg *et al.*, 2009). *L. cyprinacea* est un parasite des poissons d'eau douce qui s'attache aux bronches et à la peau des poissons, provoquant la lernéose (Sayyadzadeh *et al.*, 2015 ; Urku and Onalan, 2018).

La possibilité d'une forte infestation parasitaire chez les petits poissons a déjà été signalée (Tavares-Dias *et al.*, 2011). La présente étude a enregistré un maximum de huit *L. cyprinacea* à la surface de *Xiphophorus hellerii* sélectionnés. Des résultats similaires ont été rapportés dans une étude précédente où un maximum de sept parasites a été dénombré à la surface du poisson (Barros *et al.*, 2021).

Dans cette étude, la surface externe des *Xiphophorus hellerii* sélectionnés a été examinée macroscopiquement afin de mettre en évidence la présence de *L. cyprinacea* et les symptômes et lésions induits par ce parasite. L'ectoparasite *L. cyprinacea* a été fréquemment localisé dans les régions dorsale, abdominale et caudale de *Xiphophorus hellerii*, principalement sur la peau et les nageoires et dans une moindre mesure sur les yeux. Des localisations similaires ont déjà été décrites dans des études sur l'infestation des poissons par ce parasite (Sayyadzadeh *et al.*, 2015 ; Urku and Onalan, 2018; Barros *et al.*, 2021). Les signes enregistrés suite à l'infestation du poisson *Xiphophorus hellerii* par *L. cyprinacea* au cours de notre étude sont similaires à ceux décrits dans des études antérieures sur la lernéose chez différentes espèces de poissons d'eau douce (Urku and Onalan, 2018 ; Barros *et al.*, 2021) et consistaient principalement en une perte d'écailles, des ulcères cutanés, une hémorragie et de l'œdème. De plus, l'examen histopathologique réalisé lors de notre étude sur *X. hellerii* infesté par *L. cyprinacea* a révélé la présence de plusieurs lésions, notamment des œdèmes, du mucus, des maursures, des ulcérations, des dégénérescences musculaires, des imprégnations calciques et des foyers inflammatoires. Les lésions démontrées dans la présente étude sont similaires à celles décrites par des études antérieures sur la lernéose chez certaines espèces de poissons d'eau douce (Noor El-Deen *et al.*, 2013 ; Mirzaei, 2015 ; Urku and Onalan, 2018 ; Ramalingam *et al.*, 2023).

Par ailleurs, plusieurs facteurs affectent le développement de *L. cyprinacea* et sa pathogénèse, notamment la température. En effet, une température inférieure à 15°C inhibe le cycle de vie du parasite (**Mirzaei, 2015**). Tandis que des températures de l'eau allant de 22 à 25°C optimisent son développement (**Urku and Onalan, 2018**). Au cours de notre étude, une température de l'eau de 22°C a été enregistrée en été, lors des périodes de forte infestation par *L. cyprinacea*. Ces données corroborent celles évoquées plus haut (**Urku and Onalan, 2018**).

Au cours de notre étude, les paramètres physico-chimiques de l'eau tels que le pH, la température, la salinité, la conductivité, le TDS (Total Dissolved Solids), la densité relative (SG) et le potentiel redox (ORP) ont été mesurés afin de déterminer la qualité et la pureté de l'eau utilisée après traitement des poissons. Les données obtenues ont montré une diminution des valeurs de pH, de salinité, de conductivité et de TDS de l'eau d'aquarium traitée avec l'extrait aqueux de *S. argel*.

La valeur du pH enregistrée pour l'eau traitée avec l'extrait aqueux de *S. argel* est légèrement inférieure à celles trouvées pour les aquariums témoins et le standard Praziquantel. Cependant, cette valeur reste dans la fourchette normale (6,5-8,5) recommandée par l'**US EPA (2009)** et l'**OMS (2006)**. En effet, la protection des habitats aquatiques est assurée dans une plage de pH de 6,5 à 9,0 unités (**Dirican, 2015**).

La conductivité est la capacité de l'eau à transporter le courant électrique et constitue un moyen d'évaluer la pureté de l'eau (**Qureshimatva et al., 2015**). Cela dépend des ions présents dans l'eau, de leur concentration relative, de leur mobilité et de leur valence (**Debangshu et al., 2022**). Dans notre étude, la valeur de la conductivité électrique enregistrée pour l'eau de l'aquarium traitée avec l'extrait aqueux de *S. argel* représente la moitié des valeurs enregistrées pour l'eau des aquariums témoin et standard, ce qui suggère que l'eau additionnée d'extrait aqueux de *S. argel* est plus pure. La conductivité est proportionnelle à la température, à la salinité et au total des solides dissous (**Debangshu et al., 2022**). Cela est en corrélation avec les valeurs de salinité et de TDS trouvées dans notre étude. En effet, les valeurs de salinité et de TDS de l'eau traitée avec l'extrait aqueux de *S. argel* représentent la moitié de celles enregistrées pour l'eau des aquariums témoin et standard.

Il existe une variété de produits chimiques utilisés dans le traitement et le contrôle des infestations des poissons par les copépodes de *Lernaea*, notamment le chlorure de sodium, le permanganate de potassium, le formol, le vert de malachite (**Kumaraguru et al., 2006**), ainsi

que des pesticides tels que les organophosphates ou les pyréthriinoïdes synthétiques (**Hemaprasanth et al., 2006**). L'utilisation excessive de ces produits a entraîné des dommages considérables à l'environnement et à la santé humaine, d'où la nécessité d'identifier de nouvelles substances moins nocives et possédant des propriétés antiparasitaires (**Hemaprasanth et al., 2008**). L'utilisation de plantes médicinales en aquaculture présente plusieurs avantages, notamment une faible toxicité, un coût moindre, peu d'impact environnemental, des niveaux de résidus réduits chez les animaux et une diminution de la résistance aux médicaments (**Hashimoto et al., 2016**). Les travaux de **Furtado et al., (2021)** ont rapporté l'effet antiparasitaire de l'extrait de biomasse citrique ainsi que celui des huiles nano-émulsionnées d'oléorésine et d'acicule de *Pinus sp.*, contre les nauplii et les copépodites de *L. cyprinacea*. Dans une étude précédente, l'efficacité des huiles essentielles de *Lippia sidoides* et de *Mentha piperita* contre les parasites monogéniques a été rapportée, cependant, les auteurs recommandent uniquement l'utilisation de l'huile essentielle de *Mentha piperita* en bain thérapeutique pour sa sécurité pour les poissons (**Hashimoto et al., 2016**).

Par ailleurs, les travaux de **Steverding et al., (2005)** ont rapporté que l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* est une alternative naturelle à la chimiothérapie actuelle pour traiter les infestations de poissons par *Gyrodactylus spp.*, et pourrait être utilisée comme parasitocides commerciaux). Une autre étude a démontré l'efficacité des extraits bruts d'*Allium sativum* et de *Terminalia catappa* dans le traitement des ectoparasites *Trichodina sp* chez le tilapia (**Chitmanat et al., 2005**). Une étude récente a obtenu des données *in vivo* et *in vitro* intéressantes sur l'effet antiparasitaire de l'huile essentielle d'anis étoilé contre l'infestation de poissons d'eau douce par *Lernaea cyprinacea* (**Attia et al., 2022**).

Dans la présente étude, le traitement de poissons *X. hellerii* infestés par *L. cyprinacea* avec l'extrait aqueux de *S. argel* a provoqué la mort du parasite sans affecter l'état général du poisson. Le même résultat a été obtenu avec le traitement de *X. hellerii* avec l'antiparasitaire praziquetel. La caractérisation phytochimique de l'extrait aqueux de *S. argel* a montré que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les saponines sont les composants les plus réactifs de l'extrait.

Plusieurs flavonoïdes ont pu être identifiés en comparant leurs spectres UV, leurs masses moléculaires et leurs fragments MS₂ avec la littérature. Les plus représentatifs d'entre eux sont la rutine (**Chen et al., 2015 ; Singh et al., 2017**), le kaempférol-3-O-rutinoside (**Monagas et al., 2007 ; Chen et al., 2015**), le kaempférol-3-O-diglucoside-7-O-glucoside

(Harbaum et al., 2007), le kaempférol (Monagas et al., 2007 ; Lin et al., 2008) et la quercétine. En revanche, de nombreux acides pholiques ont été identifiés, notamment l'acide 3-acétyl-4-cafféoylquinique (Singh et al., 2017), l'alcool caféoylique 3/4 hexoside (Martini et al., 2017), l'alpha-1-cafféoylglucose (Rahmouni et al., 2018), l'acide alpha-hydroxybenzoïque (Ibrahim et al., 2015) et l'acide férulique. L'existence de dérivés de saponine a également été rapportée (Hassan et al., 2001).

L'effet antiparasitaire de l'extrait aqueux de *S. argel* enregistré contre *L. cyprinacea* pourrait être le résultat de l'action synergique entre ces composants. En effet, les flavonoïdes constituent une classe de métabolites secondaires connus pour leurs effets antiparasitaires contre de nombreux parasites. Ces composants sont caractérisés par un mécanisme d'action à multiples facettes. On pense que les flavonoïdes agissent en inhibant des enzymes et des protéines importantes et contrecarrent la résistance aux médicaments en se liant au domaine de liaison aux nucléotides des transporteurs multidrogues de la glycoprotéine P (Mead and McNair, 2006). Un autre mécanisme d'action des flavonoïdes est l'apoptose. En effet, les flavonoïdes peuvent induire l'apoptose des cellules hôtes (Wenzel and Daniel, 2004) voire celle du parasite (Mamani-Matsuda et al., 2004).

Les saponines sont également dotées d'un potentiel antiparasitaire qui consiste en la formation de complexes avec le cholestérol membranaire entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire et une fuite conséquente du contenu cytoplasmique à travers la bicouche lipidique (Barbosa, 2014). Les tanins sont également connus pour leur action antiparasitaire qui vise à contrôler le développement du parasite aux différentes phases de croissance en perturbant le cycle de vie du parasite, en inhibant l'éclosion des œufs, en réduisant le développement larvaire et en éliminant les larves non développées (Tong et al., 2022).

5. Conclusion

L'utilisation de la solution aqueuse à base de *S. argel* pour le traitement des poissons *Xiphophorus hellerii* a entraîné une élimination efficace du parasite *Lernaea cyprinacea* ainsi qu'une amélioration de la qualité de l'eau de l'aquarium.

Discussion Générale

Discussion générale

L'utilisation des plantes médicinales est profondément enracinée dans l'histoire et les traditions des civilisations et intégrée dans la médecine traditionnelle de pratiquement toutes les cultures (**Aboul-Enein et al., 2012**). Dans les pays en développement, une grande partie de la population dépend encore de la médecine traditionnelle pour traiter des maladies graves (**Tad Al-Deen et Al Naqeb, 2014**). Malgré le développement de la médecine conventionnelle dans notre pays, la phytothérapie représente encore aujourd'hui l'un des domaines les plus importants de la médecine traditionnelle, en particulier dans les zones rurales algériennes.

L'utilisation des plantes en toute sécurité requière une connaissance non seulement de leurs effets bénéfiques mais aussi des effets toxiques que peut engendrer leur usage inadéquat. Le présent travail a eu comme principal objectif l'étude de l'innocuité et des propriétés anti-inflammatoire, antalgique, cicatrisante, antiulcéreuse, antidiabétique, antibactérienne et antioxydante des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *Solenostemma argel* ainsi que de son huile essentielle. Une détermination de la composition phytochimique des trois extraits et de l'huile essentielle de *S. argel* par LCMS, GCMS et RMN a été également entreprise.

Le choix des activités pharmacologiques évaluées dans cette thèse a été guidé par les résultats de l'enquête ethnobotanique réalisée sur terrain à Tamanrasset auprès de la population Touareg. L'étude de la toxicité aiguë par voie orale de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* aux doses de 500, 1000 et 2000 mg/kg n'a révélé aucun signe de morbidité ou de mortalité chez les rats mis en expérimentation, ce qui reflète une bonne tolérance de ces extraits par ces derniers. En se basant sur les directives du système de classification globalement harmonisé de l'OCDE (**SGH, 2013**), les extraits et l'huile essentielle testés peuvent être classés dans la catégorie 5 et considérés comme des substances non toxiques par voie orale.

Cependant, l'étude anatomopathologique réalisée au cours du test de toxicité de l'OCDE a mis en évidence des modifications pathologiques significatives au niveau du foie, des reins et des poumons des rats traités, respectivement, par les trois extraits étudiés aux doses de 1000 et 2000 mg/kg ; contrairement au groupe traité par l'huile essentielle chez lequel des lésions minimales ont été révélées à la dose de 2000 mg/kg. Par conséquent, les extraits acétonique,

méthanolique et aqueux de *S. argel* peuvent être toxiques par voie orale aux doses élevées, à la différence de l'huile essentielle qui est moins nocive par voie orale. Cette étude est la première de ce genre à être réalisée pour *S. argel*.

De plus, nos travaux ont permis de mettre en évidence pour la première fois le pouvoir cytotoxique de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel*, démontrant ainsi qu'ils pourraient être de bons candidats pour le développement futur de médicaments anti-cancéreux.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* sur le radical DPPH a démontré leur pouvoir antioxydant. Ces résultats corroborent ceux obtenus par **Tad Al-Deen et Al Nageb (2014)** au Yemen, qui ont décrit un effet antioxydant de l'extrait méthanolique de *S. argel* sur le radical DPPH équivalent à celui de notre propre extrait (**Tad Al-Deen et Al Nageb, 2014**). En revanche, des résultats différents ont été rapportés par une étude réalisée sur les extraits hydro-alcooliques acétone/eau (80/20) et éthanol/eau (80/20) de *S. argel* originaire d'Egypte sur le radical DPPH (**Ibrahim et al., 2015**).

Au cours de la présente étude, un puissant pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* et de son composant majoritaire le linalol a été démontré envers six souches bactériennes d'intérêt médical, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Salmonella enterica choleraesuis* ATCC 14028 avec détermination des valeurs CMI et CMB pour chacune des souches testées. Cette étude est la première à avoir déterminé les valeurs CMI et CMB de l'huile essentielle des feuilles de *S. argel* originaire d'Algérie pour les souches testées ainsi que le taux de participation de son composant majoritaire le linalool dans l'effet antibactérien enregistré.

Dans une étude précédente, cinq extraits de *S. argel* originaire du Soudan (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, éthanol et eau distillée) ont été soumis à un dosage antibactérien à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose contre deux bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Quatre extraits, à l'exception de l'éther de pétrole, ont montré une action inhibitrice claire contre les deux bactéries. Néanmoins, cette étude a présenté les effets antibiotiques contre seulement deux bactéries différentes et n'a pas inclus l'analyse de la CMI et la CMB (**Hamadnalla et El Jack, 2019**).

Une autre étude a permis de mettre en évidence l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des fruits de *S. argel* contre les bactéries *S. pneumoniae*, *E. coli*, *S. typhimurium* et *B. cereus* (**Chouitah et al., 2016**).

Le présent travail a également permis l'évaluation de l'effet anti-inflammatoire des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que de l'huile essentielle de *Solenostemma argel* selon trois modèles expérimentaux, le modèle de l'œdème de la patte de rat induit par la carragénine, le modèle de l'œdème de l'oreille induit par le xylène et le modèle du granulome induit par les pellets de coton. Les trois extraits testés ont présenté un effet anti-inflammatoire équivalent contre l'inflammation aiguë, topique et chronique contrairement à l'huile essentielle qui a montré un pouvoir anti-inflammatoire plus important. Dans le même contexte, une étude a permis de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de l'extrait chloroformique des feuilles de *S. argel* originaire du Soudan suivant le modèle de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris (**Innocenti et al., 2005**). Une autre étude a déterminé, *in vitro*, l'activité anti-inflammatoire des extraits hydro-alcoolique acétone/eau (80/20) et éthanol/eau (80/20) de *S. argel* originaire d'Egypte par le test de dénaturation de l'albumine (**Ibrahim et al., 2015**).

Une autre étude décrite dans le présent travail est l'activité anti-nociceptive des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que de l'huile essentielle de *S. argel*, qui a été réalisée selon trois modèles expérimentaux, à savoir, le test de torsions abdominales induites par l'acide acétique, le test au formaldéhyde et le test de la plaque chauffante. Bien que l'effet analgésique de l'extrait aqueux de *S. argel*, originaire du Soudan, a été décrit auparavant sur un modèle murin (**Mudawi et al., 2015**), les résultats obtenus étaient moins significatifs que ceux décrits dans la présente étude pour le même modèle d'étude. En effet, notre étude a permis de démontrer pour la première fois l'effet analgésique des extraits acétonique et méthanolique ainsi que celui de l'huile essentielle sur la douleur centrale et périphérique.

Dans le présent travail, la formulation de trois pommades à base des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi qu'une crème à base de l'huile essentielle de *S. argel*, respectivement, a été effectuée afin d'évaluer le potentiel cicatrisant de ces derniers ainsi que leur toxicité cutanée. Ainsi, les trois extraits testés ont montré un effet cicatrisant intéressant, néanmoins, l'huile essentielle de *S. argel* a enregistré un pouvoir cicatrisant supérieur à celui de ces derniers. Cette étude a permis la détermination, pour la première fois, de l'activité cicatrisante des extraits acétonique, méthanolique et aqueux ainsi que de l'huile essentielle de

S. argel d'Algérie. Par ailleurs, une étude récente a également permis de mettre en évidence l'activité cicatrisante des extraits éthyle-acétate et méthanolique de *S. argel* originaire d'Egypte (**Abdel-Motaal et al., 2022**).

La présente étude a documenté pour la première fois, l'activité antiulcéreuse de l'huile essentielle et des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* sur deux modèles expérimentaux l'ulcère induit par l'aspirine et l'ulcère induit par la ligature du pylore, déterminant ainsi leurs potentiels cytoprotecteurs et anti-sécrétoires. Par ailleurs, une étude récente a révélé que la fraction de mucilage isolée de *S. argel*, originaire d'Egypte, avait des effets gastroprotecteurs significatifs contre les lésions gastriques induites par l'éthanol (**El-shiekh et al., 2021**).

Au cours de cette étude, l'activité antidiabétique des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S. argel* a été déterminée selon le modèle du diabète induit par l'alloxane en mettant en évidence l'effet de ces extraits sur les complications liées au diabète, notamment l'effet neuroprotecteur. L'étude du pouvoir neuroprotecteur est la première de ce genre pour la plante *S. argel*. Par ailleurs, une étude précédente avait mis en évidence l'effet hypoglycémiant de l'extrait méthanolique de *S. argel*, originaire du Yemen, à la dose de 1g/kg selon le modèle de l'hyperglycémie induite par la méthylprédnisolone (**Taj Al-Deen et Al Naqeb, 2014**).

Les différences rapportées par les ces études seraient en partie expliquées par les conditions écologiques, d'altitude et de climat de la culture de la plante étudiée, ainsi que par les différences d'origine génétiques à l'origine de différents chémotypes au sein d'une même espèce, auquel doit s'ajouter le choix du solvant d'extraction. Cependant, des études comparatives de génomes des différents cultivars de *S. argel* devraient être menées pour objectiver cette hypothèse.

La comparaison des effets des extraits acétonique, méthanolique et aqueux sur les différentes activités pharmacologiques évaluées, montre un potentiel équivalent et dose dépendant. Cela pourrait s'expliquer par la présence de composants actifs en commun. En effet, l'analyse, dans la présente étude, de ces trois extraits par la technique UHPLC/DAD/ESI-MS² a permis de mettre en évidence plusieurs composants en commun, principalement des flavonoïdes et des saponosides, à savoir l'apigenin-O-pentosyl hexoside, la quercétine-3-O-rutinoside (rutine), le kaempferol-3-O-rutinoside, le kaempferol-3-O- diglucoside-7-O-glucoside, le

kaempférol et les dérivés de la quercétine. En effet, les flavonoïdes sont des substances connues pour leurs propriétés antioxydante (**Ghasemzadeh et al., 2011**), anti-inflammatoire (**Garcia-Lafuente et al., 2009**), antinociceptive (**Eldahshan et Abdel-Daim, 2014**), cicatrisante, antiulcéreuse (**Sumbul et al., 2011**) et antidiabétique (**Chen et al., 2015**).

Par ailleurs, l'huile essentielle de *S.argel* a présenté des effets remarquables, supérieurs à ceux des trois extraits étudiés. Ces effets antibactérien, anti-inflammatoire, analgésique, cicatrisant et antiulcéreux pourraient être la conséquence de l'action synergique des différents composants identifiés par la technique GCMS, notamment le géraniol (**De Carvalho et al., 2013; La Rocca et al., 2017; Lira et al., 2020**), le nérol (**González-Ramírez et al., 2016**), l' α -terpinéol (**Souza et al., 2011; Oliveira et al., 2012; Huang et al., 2020**), le limonène (**Rozza et al., 2011; Russo et Marcu, 2017**) et son composant majoritaire le linalol (**Peana et al., 2003; Aprotosoia et al., 2014; Da Silva et al., 2016**). Ce dernier a été isolé pour la première fois à partir de cette huile par la technique RMN dans la présente étude.

Un autre volet de cette étude est l'application, pour la première fois, de *S. argel* en médecine vétérinaire avec l'obtention de très bons résultats après le traitement de plusieurs cas cliniques. *S. argel* pourrait ainsi représenter un bon candidat en phytothérapie vétérinaire.

À la lumière des résultats obtenus au cours de cette étude, il apparaît que l'huile essentielle de *S. argel* se profile comme une candidate remarquable en raison de son innocuité et de son efficacité pour le développement de nouveaux composés alternatifs afin de surmonter les problèmes de la résistance microbienne, le traitement des plaies et des ulcères ainsi que l'inflammation et la douleur. Cependant, son faible rendement représente un frein à ne pas négliger pour un développement à grande échelle. Enfin, l'extrait aqueux de *S.argel* pourrait constituer un excellent agent antidiabétique et neuroprotecteur à la dose testée.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

L'usage de plantes médicinales implique une connaissance précise non seulement de leurs propriétés thérapeutiques mais également de leurs éventuels effets toxiques. Le présent travail a constitué une contribution originale et préliminaire à l'étude de la composition phytochimique, de la toxicité et des propriétés anti-inflammatoire, antalgique, cicatrisante, antioxydante, antibactérienne, antiulcéreuse, antidiabétique et neuroprotectrice des extraits acétonique, méthanolique et aqueux de *S.argel* ainsi que de son huile essentielle, apportant ainsi une base scientifique à l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle.

Cette étude a permis, également, l'application des extraits et de l'huile essentielle de *S.argel* en médecine vétérinaire. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires tant sur le plan chimique que sur le plan biologique.

En effet, sur le plan phytochimique, il serait intéressant d'effectuer une chromatographie préparative dans le but de purifier et d'isoler les composants actifs de cette plante et dans le cas échéant leur synthèse chimique.

Sur le plan biologique, une mise en évidence des mécanismes d'action de l'huile essentielle et des extraits testés serait nécessaire, notamment l'étude des médiateurs de l'inflammation de manière individuelle comme le TNF-alpha, l'IL-1, l'IL-6 ainsi que la voie des cyclooxygénases et des prostaglandines pour la douleur.

Pour l'action antibiotique, il serait utile d'étudier la cible biologique en recherchant des bactéries mutantes résistante aux antibiotiques et d'identifier le ou les gènes mutés. Pour la cicatrisation, il serait intéressant de développer des modèles *in vitro*. Les effets sur l'étape de prolifération sont particulièrement intéressants à étudier à côté des aspects purement anti-inflammatoires déjà envisagés. En effet, la vitesse de cicatrisation est un des aspects les plus spectaculaires décrits dans notre étude. Donc la stimulation de la production de collagène et de matrice extracellulaire sera étudiée ainsi que l'angiogenèse. Les extraits devant être administrés par voie orale ou par voie parentérale doivent faire l'objet d'études plus poussées de pharmacodynamie et de pharmacocinétique.

Enfin, les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse seront valorisés par la soumission de dossiers de demande de brevets pour les différentes applications développées.

D'autre part, les méthodes mises en œuvre lors de cette étude pourront être utilisées pour étudier d'autres plantes de la flore algérienne afin de valoriser le patrimoine botanique national.

Références

Bibliographiques

Références Bibliographiques

Abbas RZ, Colwell DD, Iqbal Z, Khan A. Acaricidal drug resistance in poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) and approaches to its management. *World's Poultry Science Journal*. 2014; 70(1): 113-124.

Aboul-Eneim AM, Abu El-Ela F, Shalaby EA, EL-Shemy A. Traditional medicinal plants research in Egypt: Studies of antioxidant and anticancer activities. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6(5), pp. 689-703

Abdel-Motaal FF, Maher ZM, Ibrahim SF, El-Mleeh A, Bahary M, Metwally A. Comparative Studies on the Antioxidant, Antifungal, and Wound Healing Activities of *Solenostemma argel* Ethyl Acetate and Methanolic Extracts. *Appl. Sci.* 2022, 12, 4121.

Abdel-Raheem IT. Gastroprotective effect of rutin against indomethacin-induced ulcers in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2010, 107, 742–750. [L]
[SEP]

Abu-Reidah IM, Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Arráez-Román D, Segura-Carretero A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry*. 2015 ; 166:179–191.

Abubakar AR, Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *J Pharm Bioall Sci* 2020; 12:1-10.

Abubakar AR, Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. 2020; 12(1): 1-10.

Ács G, Palkovits M, Blumberg PM. [³H] Resiniferatoxin binding by the human vanilloid (capsaicin) receptor. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994 ; 23 : 185–190.
Aebi, H. Catalase. *Methods Enzymol.* 1984 ; 105 : 121–126. [L]
[SEP]

AFMPS - Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé (Belgique) (2010) Formulaire thérapeutique magistral. Edition 2010. Brussels.

Afroza B, Iswar H, Jaikumar S, Akila KP, Shefeer KA. Anti-ulcer activity of polyherbal formulation – ro12 on experimentally induced ulcer in rats. *Int J Phytopharm.* 2014 ; 5 (6) : 406-410. e- ISSN 0975 – 9328.

Afroza B, Iswar H, Jaikumar S, Akila KP, Shefeer KA. Anti-ulcer activity of polyherbal formulation – ro12 on experimentally induced ulcer in rats. *Int. J. Phytopharm.* 2014; 5(6): 406-410.

Afroze N, Pramodh S, Almutary AG, Rizvi TA, Rais N, Raina R, Faiyazuddin M, Alnuqaydan AM, Hussain A. Kaempferol Regresses Carcinogenesis through a Molecular Cross Talk Involved in Proliferation, Apoptosis and Inflammation on Human Cervical Cancer Cells, HeLa. *Applied Sciences*. 2022; 12(6):3155.

Ahmed MM. Hepatoprotective role of *Solenostemma argel* growing in Egypt on ethanol induced oxidative damage in rats. *Turkish J. Biochem*. 2017 ; 42: 419–426.

Ahmed MW, Roshan S, Mahammed N, Muqem Nasir MA. Anti-ulcer effect of nigella sativa linn. Against gastric ulcers in rats. *Int. J. Res. Dev. Pharm. L. Sci*. 2016; 5(2) 2006-2009.

AL-Ishaq RK, Abotaleb M, Kubatka P, Kajo K, Büsselberg D. Flavonoids and Their Anti-Diabetic Effects: Cellular Mechanisms and Effects to Improve Blood Sugar Levels. *Biomolecules*. 2019; 9: 430.

Al-Mekhlafi FA, Abutaha N, Farooq M, Al-Wadaan M. Insecticidal effect of *Solenostemma argel* extracts against *Culex pipiens*. *Journal of American Mosquito Control Association*. 2018; 34(3): 217-223.

Alam MN, Bristi NJ, Rafiquzzaman Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013 ; 21 : 143–152.

Alarcon De La LC, Martin MJ, Motilva V. Antiulcer and gastroprotective effects of quercetin., a gross and histologic study. *Pharmacology* 1994, 48, 56-62.

Ali Sangi SM, Al Jalaud NA. Prevention and treatment of brain damage in streptozotocin induced diabetic rats with metformin, Nigella sativa, Zingiber officinale and Punica granatum. *Biomed. Res. Ther*. 2019; 7(6):3274-3285.

Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants* 2017; 6 : 42.

Altinterim B. Bitter Melon (*Momordica charantia*) and the Effects of Diabetes Disease. *Ziraat Fakültesi Dergisi, Uludağ Üniversitesi*. 2012; 26(2) : 65–69.

Amariei D, Stanescu U, Gille E, Onisei T. The biosynthetic capacity of the active principles of “in vitro” regenerated *Solenostema argel* (SEL). *Hayne. callus and shoots*. *Rev. Roum. Biol. Veget.*, Bucharest. 1991, 38 (1–2), 71.

Amraie E, Farsani MK, Sadeghi L, Khan TN, Babadi VY, Adavi Z. The effects of aqueous extract of alfalfa on blood glucose and lipids in alloxan-induced diabetic rats. *Interventional Medicine & Applied Science*. 2015; 7 (3), pp. 124–128.

Ankur R, Shahjad A. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 2012; 3 (2).

Aprotosoiaie AC, Hăncianu M, Costache I, Miron A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour Fragr. J*. 2014

Arrau S, Delporte C, Cartagena C, Rodríguez-Díaz M, González P, Silva X, Cassels BK, Miranda HF. Antinociceptive activity of Quillaja saponaria Mol.saponin extract, quillaic acid and derivatives in mice. J. Ethnopharmacol. 2011; 133: 164-167.

Assis Oliveira F, Andrade LN, de Sousa EB, de Sousa DP. Antiulcer activity of essential oil constituents. Molecules. 2014; 19(5):5717-47.

Attia M M, Alzahrani A M, Hanna M I, Salem H M, Abourehab M A S, El-Saadony M T and Thabit H. The Biological Activity of *Illicium verum* (Star Anise) on *Lernaea cyprinacea*-Infested *Carassius auratus* (Goldfish): In Vivo Study. Life. 2022: 12,2054.

Avenant-Oldewage A. *Lernaea cyprinacea* and related species. In: Woo PTK, Buchmann K (eds), Fish parasites pathobiology and protection. CAB International Press, UK, 2012: pp 337– 349.

Azwanida NN. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. Med Aromat Plants. 2015 ; 4: 196.

Baily CC, Baily OT. Production of diabetes mellitus in rabbits with alloxan. A preliminary report. J Am Med Ass. 1943 ; 122 : 1165–1166.

Bakkali FS, Averbeck D, Averbeck M, Idaomar. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. 2008 ; 46 : 446–475.

Balick MJ, Cox PA. Plants, People, and Culture. The Science of Ethnobotany. Scientific American Library, New York, USA, 1996.

Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2016 ; 6 : 71–79.

Banu KS, Cathrine L. General techniques involved in phytochemical analysis. Int J Adv Res Chem Sci. 2015 ; 2 : 25-32.

Baravalia Y, Vaghasiya Y, Chanda S. Brine Shrimp Cytotoxicity, Anti-inflammatory and Analgesic Properties of *Woodfordia fruticosa* Kurz Flowers. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 2012, 11 (3): 851-861.

Barbosa P. An overview on the biological and pharmacological activities of saponins. Int J Pharm Pharm Sci. 2014; 6: 47-50.

Barros M A, Araújo L F , Gomes B A, Takakura K Y, Sousa L O and Magalhães-Matos P C. *Lernaea cyprinacea* Linnaeus, 1758 (Cyclopoida: Lernaeidae) in ornamental fish from a commercial fish farm in the state of Pará, Brazilian Amazon. Brazilian Journal of Biology. 2021: 84, e254338.

Barrot M. Tests And Models Of Nociception And Pain In Rodents. Neuroscience. 2012; 211 : 39–50.

Bashir Hassan S, Gali-Muhtasib H, Göransson H, Larsson R. Alpha Terpineol: A Potential Anticancer Agent which Acts through Suppressing NF- κ B Signalling. Anticancer Research. 2010; 30 (6) 1911-1919.

Beaucournu JC, Launay H. (1990). Les puces (Siphonaptera) de France et du bassin méditerranéen occidental. Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles, Paris, 1990; 548 p.

Beaucournu JC, Menier K. (1998). Le genre Ctenocephalides, Stiles et Collins, 1930 (Siphonaptera: Pulicidae). Parasite. 1998 5, p. 13-16.

Behrend E, Holford A, Lathan P, Rucinsky R, Schulman R. Diabetes Management Guidelines for dog and cat. American Animal Hospital Association. 2018 ; 54 (1) : 1-19.

Benarroch EE. Pain-autonomic interactions. Neurol. Sci. 2006 ; 27 : s130–s133. [1] [SEP]

Benchelah AC, Bouziane H, Maka M. Fleurs du Sahara, arbres et arbustes, voyage au cœur de leurs usages avec les touaregs du Tassili. Phytothérapie. 2004 ; 6 : 191-197.

Benhouhou S. *Solenostemma argel (Del.) Hayne*. In : A guide to medicinal plants in North Africa. Centre for Mediterranean Cooperation, International IU CN, 2005. ISBN : 2831708931.

Benmaarouf DK, Pinto DCGA, China B, Zenia S, Bouzid Bendesari K, Ben-Mahdi MH. Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive effects of acetone extract of algerian *solenostemma argel* (delile) hayne leaves. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 2020; 12(5): 72-81.

Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power?: The FRAP assay. Anal. Biochem. 1996 ; 239 : 70–76.

Bhattacharya A, Naik MR, Divya A, Rath K, Kumar S, Mishra SS. Antipyretic, anti-inflammatory, and analgesic effects of leaf extract of drumstick tree. J. Young Pharm. 2014; 6: 20-24.

Bhattamisra SK, Yan VLY, Lee CK, Kuean CH, Candasamy M, Liew YK, Sahub PS. Protective activity of geraniol against acetic acid and Helicobacter pylori- induced gastric ulcers in rats. J. Trad. Complementary. Med. 2019; 19(3): 206-214.

Birch M, Tomlinson A, Ferguson MWJ. Animal Models for Adult Dermal Wound Healing. In : Methods in Molecular Medicine.; Fibrosis Research: Methods and Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, Vol. 117, 2005.

Blois MS. Antioxydant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 1958; 181:1199-200. [1] [SEP]

Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. Mutat Res. 2002 ; 512 : 121–134.

Bosser J. Espèces nouvelles dans le genre Dalbergia (Fabaceae, Papilionoideae) à Madagascar. ADANSONIA. Publications Scientifiques du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris. 2005 ; 27 (2) : 209-216.

Boulos L. Medicinal plants of North Africa. Reference Publications Inc., Algonac, Michigan, USA, 1983. ISBN : 10-0917256166.

Bourdoiseau G, Pin D. Habronémose équine cutanéomuqueuse : actualités. Le Point Vétérinaire. Revue n°018, 2018.

Bribi N, Belmouhoub M, Maiza F. Analgesic and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Fumaria capreolata*. Phytothérapie. 2017 ; 15 (4) : 211-216.

Bruce CR, Carey AL, Hawley JA, Febbraio MA. Intramuscular heat shock protein 72 and heme oxygenase-1 mRNA are reduced in patients with type 2 diabetes: evidence that insulin resistance is associated with a disturbed antioxidant defense mechanism. Diabetes. 2003; 52(9):2338–2345.

Bucar F, Wube A, Schmid M. Natural product isolation – how to get from biological material to pure compounds. Nat. Prod. Rep. 2013 ; 30 : 525.

Caldas GFR, Costa IMA, Silva JBR, Nobrega RF, Rodrigues FFG, Costa JGM, Wanderlay AM. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). J. Ethnopharmacol. 2011; 137: 886–892. [SEP]

Canturk Z, Dikmen M, Artagan O, Ozarda MG, Ozturk N. Cytotoxic Effects of Resveratrol, Rutin and Rosmarinic Acid on ARH–77 Human (Multiple Myeloma) Cell Line. Natural Product Communications. 2016; 11 (10).

Caparica R, Júlio A, Araújo MEM, Baby AR, Fonte P, Costa JG, Santos de Almeida T.. Anticancer Activity of Rutin and Its Combination with Ionic Liquids on Renal Cells. Biomolecules. 2020; 10(2), 233.

Carocho M, Ferreira ICFR. A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. Food Chem. Toxicol. 2013 ; 51 : 15–25. [SEP]

Carson CF, Riley TV. Non-antibiotic therapies for infectious diseases. Commun. Dis. Intell. 2003 ; 27 : S143–S146.

Carson MD. Medical Botany : Materia Medica. Vol 11, Philadelphia, 1847.

Carvalho KIM, Bonamin F, Santos RCD, Périco LL, Beserra FP, Sousa DP, Filho JMB, Rocha LRM, Hiruma-Lima CA. Geraniol—a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2013; 387(4):355-65.

Casley-Smith JR, Morgan RG, Piller NB. Treatment of lymphedema of the arms and legs with 5,6-benzo-[alpha]-pyrone. N Engl J Med, 1993; 329: 1158-1163.

Cavelier A. Cours phytopharmacie. Ed. Inst. Nat. Agro. El-Harrach, T.1, 1976, 514 p.

Cen-Pacheco F, Ortiz-Celiseo A, Peniche-Cardena A, Bravo-Ruiz O, López-Fentanes FC, Valerio-Alfaro G, Fernández JJ. Studies on the bioactive flavonoids isolated from *Azadirachta indica*. Natural Product Research. 2020; 34(24): 3483-3491.

Chang MY, Shen YL. Linalool exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity. *Molecules*. 2014;19(5):6694-6706.

Chen J, Mangelinckx S, Adams A, Wang, Z, Li W, Kimpe N. Natural Flavonoids as Potential Herbal Medication for the Treatment of Diabetes Mellitus and its Complications. *Natural Product Communications*. 2015; 10 (1).

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*. 2018; (9) 6: 7204-7218.

Chen Y, Yu H, Wu H, Pan Y, Wang K, Jin Y. Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in pollen typhae for transformation rule exploration. *Molecules*. 2015 ; 20:18352-66. [L]
[SEP]

Chevoleau P. La reproduction des poissons d'aquarium. *Animalia*. 2006; ISBN 9782915740226.

Chitmanat C, Tongdonmuan K and Nunsong W. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 2005 :27, 359–364.

Choi J, Jung HJ, Lee KT, Park HJ. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the saponin and sapogenins obtained from the stem of *Akebia quinata*. *J. Med. Food*. 2005; 8: 78-85.

Christodoulou MC, Orellana Palacios JC, Hesami G, Jafarzadeh S, Lorenzo JM, Domínguez R, Moreno A, Hadidi M. Spectrophotometric Methods for Measurement of Antioxidant Activity in Food and Pharmaceuticals. *Antioxidants*. 2022 ; 11 : 2213.

Chua LS. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 2013; 150:805-17. [L]
[SEP]

CIBAC. Techniques d'analyse : Aspects théoriques de la chromatographie en phase liquide à haute performance. I.U.T. de Créteil – Département Génie Biologie. 2009.

Clarín AMN. Contribution à l'étude de l'habronémose cutanée chez les équidés. Thèse: 2006-Tou3-4038.

CLSI: Cinical and Laboratory Standars Institute Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed., CLSI document M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012. [L]
[SEP]

CLSI: Cinical and Laboratory Standars Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

CLSI: Cinical and Laboratory Standars Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, approved standard, M2-A9, 9th ed., CLSI, Wayen,PA; 2006.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents, M26-A. Approved guideline; National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, PA, USA. 1998; 1-56238-384-1.

Compton DR, Rice KC, de Costa BR, Razdan RK, Melvin LS, Johnson MR, Martin BR. Cannabinoid structure-activity relationships: Correlation of receptor binding and *in vivo* activities. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 ; 265 : 218–226.

Corazzi T, Leone M, Maucci R, Corazzi L, Gresele P. Direct and irreversible inhibition of cyclooxygenase-1 by nitroaspirin (NCX 4016). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 315: 1331-1337.

Daffre S, Bulet P, Spisni A, Ehret-sabatier L, Rodrigues EG, Travassos LR. Bioactive natural peptides. In: Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry.* 2008 ; 35 : 597- 691.

Das K, Tiwarl RKS, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research.* 2010 ; 4(2) : 104-111.

Dawidowicz AL, Rado E, Wianowska D, Mardarowicz M, Gawdzik J. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus Vulgaris* L. *Talanta.* 2008 ; 76 : 878-884.

Debnath B, Waikhom SS, Manik D, Sanchari G, Mahesh KS, Debasish M, Kuntal M. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. *Materials Today Chemistry.* 2018 ; 9 : 56e72.

Décret exécutif n° 11-87 du 18 Rabie El Aouel 1432 correspondant au 21 février 2011 portant changement de la dénomination du parc national de l'Ahaggar », *Journal officiel de la République algérienne*, no 12, février 2011, p. 18 23

Decru E, Mul M, Nisbet AJ, Vargas Navarro AH, Chiron G, Walton J, Norton T, Roy L, Sleenckx N. Possibilities for IPM strategies in european laying hen farms for improved control of the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): Details and state of affairs. *Frontiers in Veterinary Science.* 2020; 7: 565866.

Demmak RG, Bordage S, Bensegueni, A, Boutaghane N, Hennebelle T, Mokrani EH, Sahpaz S. Chemical constituents from *Solenostemma argel* and their cholinesterase inhibitory activity. *Nat. Prod. Sci.* 2019 ; 25: 115–121.

Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 1999; 64: 337-53. [SEP]

Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 1971; 104: 15-29.

Diao WR, Hu QP, Zhang H, Xu JG. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Food Control. 2014 ; 35:109– 116.

Djebrane C, Belahcene N, Boulebda N. Veterinary phytotherapy in Algeria: *Pistacia lentiscus* as an antimicrobial model. Braz J Vet Res Anim Sci. 2021; 58: e178032.

Djemouai S. Etude de quelques groupements phytosociologiques du parc national de l'Aahaggar (wilaya de Tamanrasset). Mémoire pour l'obtention d'un diplôme de magistère en sciences agronomiques. Institut National d'Agronomie, Alger, 2008.

Dogramaci AC, Culha G, Elik SO. Dermanyssus gallinae infestation: An unusual cause of scalp pruritus treated with permethrin shampoo. Journal of Dermatological Treatment. 2010; 21(5): 319-321.

Doughari JH., 'Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents', in V. Rao (ed.), Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health, IntechOpen, London. 2012 ; 10.5772/26052.

Dubuisson D, Dennis SG. The Formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. Pain. 1977 ; 4:161–174.

Duchemin JB, Bitam I. Chapitre 21. *Les puces (Siphonaptera)* In : Entomologie médicale et vétérinaire. Marseille : IRD Éditions, 2017. ISBN : 9782709923774.

Dunn JS, McLetchie NGB. Experimental alloxan diabetes in the rat. Lancet II. 1943 ; 384–387.

Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. Pharmacol Ther. 2008; 120:1–34.

Eglesfeld Griffith. Description of the more important plants used in medicine with their history, properties and mode of administration. Lea and Blanchard, Philadelphia, 1847.

El Aziz MMA, Ashour AS, Melad ASG. A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. J Nanomed Res. 2019 ; 7(4) : 282–288.**El Barky AR,**

El-Fishawy A. A pharmacognostical study of solenostemma argel hayne growing in Egypt. A Master Thesis, Faculty of Pharmacy, Cairo University, Egypt; 1976. ^[1]_{SEP}

EL-Hadidi MN, Fayed A. Materials of excursion Flora of Egypt. Cairo University Herbarium, Taeckholmia, 1995.

El-Kamali HH. Larvicidal Activity of Crude Aqueous Extracts of Solenostemma argel Against Mosquito Larvae. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants. 2001 ; 8(4).

El-Shiekh RA, Al-Mahdy DA, Mounair SM, Hifnawy MS, Abdel- Sattar EA. Anti-obesity effect of argel (*Solenostemma argel*) on obese rats fed a high fat diet. J. Ethnopharmacol. 2019 ; 238: 111893.

El-Shiekh RA, Salama A, Al-Mokaddem AK, Abdel-Sattar AE. Gastroprotective effect of mucilage fraction from *Solenostemma argel* via cytoprotection and attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis. J Herbmmed Pharmacol. 2021;10(2):232-240.

Eldahshan OA, Abdel-Daim MM. Phytochemical study, cytotoxic, analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities of *Strychnos nux-vomica*. Cytotechnol. 2014; 67: 831-844.

Elkotby D, Hassan KA, Emad R, Bahgat I. Histological Changes In Islets Of Langerhans Of Pancreas In Alloxan-Induced Diabetic Rats Following Egyptian Honey Bee Venom Treatments. Int. J. Pure Appl. Zool. 2017; 6(1): 1-6.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 1959 ; 82 : 70–77.

Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? J Ethnopharmacol. 1998 ; 60:1-8. ^[L]_[SEP]

Elsadig Karar MG, Kuhnert N. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS Characterization of Phenolics from *Crataegus monogyna* and *Crataegus laevigata* (Hawthorn) Leaves, Fruits and their Herbal Derived Drops (*Crataegutt Tropfen*). J Chem Biol Ther. 2016 ; 1: 102.

Emery SM, Dobrowsky RT. Promoting Neuronal Tolerance of Diabetic Stress: Modulating Molecular Chaperones. International Review of Neurobiology, 2016; 127 :181-209. ISSN 0074-7742.

Engler A. Botanische Jahrbücher. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1917.

Erben-Russ M, Bors W, Saran M. Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med. 1987 ; 52 : 393-412.

Ezer E. Novel method for producing standard subacute gastric ulcer in rats and for the quantitative evaluation of the healing process. J Pharmacol Meth. 1988 ; 20 : 279–291.

Farah AA, Ahmed EH. Beneficial antibacterial, antifungal and anti-insecticidal effects of ethanolic extract of *Solenostemma argel* leaves. Mediterranean Journal of Biosciences. 2016; 1(4): 184-191.

Fatope MO. “Phyto-compounds, their bioassay and diversity, discovery and innovation, food in O.Aruoma and B.Halliwell editions. Free Radicals and Food Additives, London: Taylor and Francis Ltd., 1995; pp. 77-119.

Fernández-Salas A, Alonso-Díaz MA, Acosta-Rodríguez R, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Rodríguez-Vivas RI. In vitro acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology. 2011; 175(1-2): 113-118.

Fibiger J, Šatínský D, Solich P. Current trends in the analysis and quality control of food supplements based on plant extracts. Anal Chim Acta. 2018 ; 1036:1-15.

Finney DJ. Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, 32 E. 57th St., New York, Ny 10022, 1971.

Fokou, JBH, Dongmo PMJ, Boyom FF. Essential Oil's Chemical Composition and Pharmacological Properties. In (Ed.), Essential Oils of Nature. IntechOpen. 2020.

Francis G, Zohar K, Harinder PSM, Klaus B. The biological action of saponins in animal systems: a review. British Journal of Nutrition. 2002 ; 88 : 587–605.

Frantz K, Byers CG. Thermal injury. Vetlearn compendium. 2011, E1-E6.

Furtado W E, Cardoso L, Medeiros P B, [L¹SEP]Lehmann N B, Bertaglia E A, Marchiori NC, Bertoldi F C and Martins M L. Antiparasitic potential of alternative treatments against larval stages of *Lernaea cyprinacea*. J Parasit Dis. 2021.

Ganeshpurkar A, Saluja A. The Pharmacological Potential of Rutin. Saudi Pharmaceutic J. 2016; 25: 149-164.

García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno MA and Martínez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. Inflam. Res. 2009; 58: 537-552.

Gatsing D, Nkeugoauapi CFN, Nkah BFN, Kuate JR, Tchouanguep FM. Antibacterial activity, bioavailability and acute toxicity evaluation of the leaf extract of *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae). Int. J. Pharmacol. 2012, 6, 173–182. [L¹SEP]

George BP, Thangaraj P, Rahul C. Anti-inflammatory and wound healing properties of *Rubus fairholmianus* Gard. root—An in vivo study. Industrial Crops and Products. 2014; 54: 216–22.

George DR, Finn RD, Graham KM, Mul M, Maurer V, Valiente Moro C, Sparagano OA. Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary medical science. Parasites & Vectors. 2015; 8: 178.

George DR, Masic D, Sparagano OAE, Guy JH. Variation in chemical composition and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* (De Geer) of four different *Eucalyptus* essential oils. Experimental and Applied Acarology. 2009; 48: 43-50. DOI: [htt](#)

George DR, Sparagano OAE, Port G, Okello E, Shiel RS, Guy JH. Environmental interactions with the toxicity of plant essential oils to the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. Medical and Veterinary Entomology. 2010; 24(1): 1-8.

Ghareeb MA, Shueb HA, Madkour HMF, Abdel-Ghany Refaey L, Abdel-Motagaly Mohamed M, Mohamed Saad A. Antioxidant And Cytotoxic Activities Of *Tectona Grandis* Linn. Leaves. International Journal Of Phytopharmacology. 2014; 5(2) : 143-157.

Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. J Med Plants Res. 2011; 5:6697-703. [L¹SEP]

Ghorbani A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. Biomed. Pharmacother. 2017; 96 : 305–312. [L¹SEP]

Gilor C, Niessen SJM, Furrow E, DiBartola SP. What's in a Name? Classification of Diabetes Mellitus in Veterinary Medicine and Why It Matters. *Perspective J Vet Intern Med.* 2016 ; 30 : 927–940.

Gipreel NT, Abdelaziz MEM, Saeed AEM, Ashwag MA. Chemical composition, phytochemical screening and anti- insecticidal activity of aqueous and ethanolic of *Solenostemma argel* extracts. *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences.* 2020; 8(6): 213-217.

Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J Clin Psych.* 2009.

Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazon J. Phenolic acids. Chapter 63. *Ann Natural Products.* 2013 ; 1951-1968.

González-Ramírez AE, González-Trujano EM, Orozco-Suárez SA, Alvarado-Vásquez N, López-Muñoz FJ. Nerol alleviates pathologic markers in the oxazolone-induced colitis model. *Eur. J. Pharmacol.* 2016; 5(776): 81-9.

Govindarajan R, Vijayakumar M, Singh M, Rao CV, Shirwaikar A, Rawat AKS, Pushpangadan P. Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. *J. Ethno. pharm.* 2006; 106: 57–61.

Grau JW, Huang YJ, Turtle JD, Strain MM, Miranda RC, Garraway SM, Hook MA. When Pain Hurts: Nociceptive Stimulation Induces a State of Maladaptive Plasticity and Impairs Recovery after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma.* 2017 ; 34 : 10, 1873-1890.

Güçlü-Üstündağ O, Mazza G. Saponins: Properties, Applications and Processing, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2007 ; 47(3) : 231-258.

Gurib-Fakim A, Schmelzer GH. Ressources végétales de l'Afrique Tropicale : Plantes médicinales 2. Fondation PROTA/CTA, Wageningen, Pays Bas, 2013. ISBN : 978-92-9081-522-8.

Gushiken LFS, Rozza AL, Vieira AJ, Beserra FP, Pellizzon CH. Essential Oils and their Use in Skin Wound Healing. *Nat Prod.* 2016 ; 3 : ^[1]_{SEP}501–513.

Güven A, Yavuz O, Cam M, Comunoglu C. Central Nervous System Complications Of Diabetes In Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: A Histopathological And Immunohistochemical Examination. *International Journal Of Neuroscience.* 2009; 119:1155–1169.

Habtemariam S. α -Glucosidase Inhibitory Activity of Kaempferol-3-O-rutinoside. *Natural Product Communications.* 2011; 6 (2).

Hamed Arafa I. New steroids from *Solenostemma argel* leaves. *Fitoterapia.* 2001 ; 57 : 747_755.

Hamadnalla HMY, El Jack MM. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of *Solenostemma argel*: A Medicinal Plant. *Open Access J. Environ. Soil Sci.* 2019, 2, 2–4.

Hamliche H, Maiza K. Traditional medicine in Central Sahara : Pharmacopia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol.* 2006 ; 105 : 358-367.

Handa SS. An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. In: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants.* International Centre For Science And High Technology Trieste, 2008.

Harbaum B, Hubbermann EM, Wolff C, Herges R, Zhu Z, Chwarz K. Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*brassica campestris* l. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC–ESI-MSn and NMR and their quantification by HPLC–DAD. *J Agric Food Chem.* 2007 ; 55:8251-60. ^[1]_{SEP}

Haridas V, Arntzen CJ, Gutterman JU. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *acacia victoriae* (Bentham), inhibit activation of nuclear factor-kappa B by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98:11557–62. ^[1]_{SEP}

Hashimoto G S O, Neto F M, Ruiz M L, Acchile M, Chagas E C, Chaves F C M, Martins M L. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* against monogenean parasites and their influence on the hematology of Nile tilapia. *Aquaculture.* 2016: 450 :182–186.

Hassabelrasoul H, Moriguchi M, Kang B, Siribel AA, Kuse M. Isolation and identification of metabolites from ethyl acetate leaf extract of *Solenostemma argel*. *Agr. Nat. Resour.* 2021 ; (55) : 757–763. ^[1]_{SEP}

Hassan HA, Hamed AI, El-Emary NA, Springuel IV, Mitomec H, Miyaoka H. Pregnene derivatives from *Solenostemma argel* leaves. *Phytochemistry.* 2001 ; 57 : 507–511.

Hassan M, Kashimura H, Matsumaru K, Nakahara A, Fukutomi H, Muto H, Goto K, Tanaka M. Phosphoramidon, an endothelin converting enzyme inhibitor, attenuates local gastric ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci.* 1997 ; 61 : 141–147.

Hegazi AA, El-Enbaawy M, Abd El-Hady FK, Ata NS. Studies for determining antimicrobial activity of *Solenostemma argel* (Del) Hayne 3-extraction with petroleum ether and ether. *Journal of the Egyptian Veterinary Medicinal Association.* 1994 ; 54, 401–411.

Hegde DA, Khosa RL, Goel RK. Antiulcer and cytoprotective action of *Wodelia calemulacea* less. *Ancient. Sci. Life.* 1996; 14: 77–81. ^[1]_{SEP}

Hemaprasanth K P, Raghavendra A, Singh R, Sridhar N and Raghunath M R. Efficacy of doramectin against natural and experimental infections of *Lernaea cyprinacea* in carps. *Veterinary Parasitology.* 2008; 156: 261–269.

Herman A, Tambor K, Herman A. Linalool affects the antimicrobial efficacy of essential oils. *Curr Microbiol,* 2015.

Hernandez-Leon A, Fernández-Guasti A, González-Trujano ME. Rutin antinociception involves opioidergic mechanism and descending modulation of ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. *Eur. J. Pain.* 2016; 20: 274-283.

Hiruma-Lima C, Gracioso J, Bighetti E, Germonsen Robineou L and Souza Brito A. The juice of fresh leaves of *Boerhaavia diffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. *J. Ethnopharmacol.* (2000) 71: 267–274.

Hobi S, Cafarchia C, Romano V, Barrs VR. Malassezia: Zoonotic implications, parallels and differences in colonization and disease in humans and animals. *Journal of Fungi.* 2022 ; 8(7) : 708.

Hocking GA. Dictionary of terms in pharmacognosy and other divisions of economic botany. Oxford: Charles Thomas. 1955. p. 212.

Honrado CP, Murakami CS. Wound healing and physiology of skin flaps. *Facial Plast Surg Clin N Am* 2005 ; 13: 203-214.

Huang J, Yang L, Zou Y, Luo S, Wang X, Liang Y, Du Y, Feng R, Wei Q. Antibacterial activity and mechanism of three isomeric terpineols of *Cinnamomum longepaniculatum* leaf oil. *Folia Microbiologica.* 2020.

Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non inflammatory pain. *Pain.* 1987; 30: 103–114.

Huo MX, Cui J, Xue G, Chi R, Chao X, Deng S, Guan J, Wei LW, Soromou H, Feng D, Wang J, *Surg. Res.* 2013, 180, E47.

Hussain A, Zia M, Mirza B. Cytotoxic and Antitumor Potential of *Fagonia cretica* L. *Turk J Bio* 2007; 31: 19-24.

Hussain MI, Abbas O, Reigosa MJ. Activities and novel applications of secondary metabolite coumarins. *Planta Daninha.* 2017 ; 35 : e017174040.

Ibrahim RM, El-Halawany AM, Saleh DO, El Naggat EMB, El-Shabrawy A, El-Rahman O. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from *securigerasecuridaca* flowers and its anti- hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. *Rev Bra Farm.* 2015 ; 25:134–41.

Ingle KP, Deshmukh AG, Padole DA, Dudhare MS, Moharil MP, Khelurkar VC. Phytochemicals: Extraction methods, identification, and detection of bioactive compounds from plant extracts. *J Pharmacogn Phytochem.* 2017 ; 6 : 32-6.

Innocenti GS, Dall’Acqua S, Sosa G, Altinier R, Loggia D. Topical anti-inflammatory activity of *Solenostemma argel* leaves. *Journal of Ethnopharmacology.* 2005 ; 102 : 307–310.

Islam S, Wilson RD. Experimentally Induced Rodent Models of Type 2 Diabetes. In: *Animal Models in Diabetes Research, Methods in Molecular Biology.* 2012 ; 933.

Izzo AA, Di Carlo G, Mascolo N, Capasso, F. Antiulcer effect of flavonoids: role of endogenous PAF. *Phytother Res.* 1994; 8: 179-181.

Jabeen F, Tharib SM, Veitch GBA. An investigation of the anti-inflammatory activity of *Solenostemma argel*. *Fitoterapia*. 1984 ; 55 : 186–189.

Jacobson S, Ross S, Bloomsmith MA. Characterizing abnormal behavior in a large population of zoo-housed chimpanzees: prevalence and potential influencing factors. *PeerJ*. 2016; 4:e2225

Jain PK, Joshi H. Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2012 ; 02(06) : 236-240

Ji-Li Fang, Shan-Shan J, Yin L, Ke Y, Song-Heng J. Extraction, Purification, Content Analysis and Hypoglycemic Effect of Mulberry marc Anthocyanin. *Pharmacognosy Magazine*. 2020; 16 (67).

John-Africa LB, Tijani AY, Christianah YI. Anti-ulcer and wound healing activities of *sida corymbosa* in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2014; 11(1):87-92.

Jones WP, Kinghorn AD. Extraction of Plant Secondary Metabolites. *Methods in Biotechnology*, Vol. 20, Natural Products Isolation, 2nd ed, 2006

Justesen U. Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *Journal of Chromatography*. 2000; 902 : 369–379

Kabubii ZN, Mbaria JM, Mbaabu PM. Phytochemical Composition and Brine Shrimp Cytotoxicity Effect of *Rosmarinus officinalis*. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*. 2015; 11 (1) : 127-135.

Kadioglu O, Nass J, Saeed ME, Schuler B, Efferth T. Kaempferol Is an Anti-Inflammatory Compound with Activity towards NF- κ B Pathway Proteins. *Anticancer Res*. 2015; 35: 2645-2650.

Kahraman A, Erkasap N, Koken T, Serteser M, Aktepe F, Erkasap S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology* 2003; 183, 133-142. [L]
[SEP]

Kamel MS. Acylated phenolic glycosides from *Solenostemma argel*. *Phytochemistry*. 2003 ; 62 : 1247–1250.

Kammerer B, Kahlich R, Biegert C, Gleiter C, Heide L. HPLC- MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations. *Phytochem Anal*. 2005; 16 : 470–8. [L]
[SEP]

Karthikeyan M, Balasubramanian T, Kumar P. *In-vivo* Animal Models and *In-vitro* Techniques for Screening Antidiabetic Activity. *J Develop Drugs*. 2016 ; 5: 153.

Kashiwada Y, Nonaka GI, Nishioka I, Chang JJ, Lee KH. *J. Nat. Prod.* 1992 ; 55 : 1033. [L]
[SEP]

Kelly SLM, Guilherme END, Pinto EFM, Luiz-Ferreira A, Souza-Brito ARM, Hiruma-Lima AC, Barbosa-Filho JM, Batista LM. Flavonoids with Gastroprotective Activity. *Molecules* 2009; 14, 979-1012.

Khaled SA, Kalman S, Istvan N. Studies on sudanese plants *Solenostemma arghel Hayne*. *Herba Hungarica*. 1974 ; 18 (3) : 33.

Khaleel C, Nurhayat T, Gerhard B. α -Terpineol, a natural monoterpene : Areview of its biological properties. *De Gruyter, Open Chem*, 2018 ; 16 : 349-361.

Khanbabaee K, Ree T. Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* 2001 ; 18 : 641–649.

Kim SI, Yi JH, Tak JH, Ahn YJ. Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Veterinary Parasitology*. 2004; 120(4): 297-304.

Kitchen I, Crowder M. Assessment of the hot-plate anti- nociceptive test in mice. A new method for the statistical treatment of graded data. *J Pharmacol Meth.* 1985 ; 13 : 1–7.

Koca Kutlu A, Cecen D, Gurgen SG. A comparison study of growth factor expression following treatment with transcutaneous electrical nerve stimulation, saline solution, povidone-iodine, and lavender oil in wounds healing. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, 2013; 361832.

Koleva II TA, van Beek TA, Linssen JP, de Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal.* 2002; 13:8–17. ^[L]_{SEP}

Konturek SJ, Piastucki I, Brzozowski T, Radecki T, Dembinska- Kiec A, Zmuda A, Gryglewski R. Role of prostaglandins in the formation of aspirin-induced gastric ulcers. *Gastroenterology*. 1981 ; 80 : 4–9.

Kosasih K, Sumaryono W, Supriono A, Mudhakir D. Cytotoxicity of ethyl acetate extract of cantigi (*Vaccinium varingiaefolium* (Blume) Miq.) young leaves on *Artemia salina* L. larvae, MCF-7, T47D, and VERO cell lines. *J Pharmacogn Phytochem.* 2019; 8(4) : 24-33. ^[L]_{SEP}

Koster R, Anderson M, de Beer EJ. Acetic acid for anal- gestic screening. *Fed Proc.* 1959 ; 18 : 412

Krause M, Heck TG, Bittencourt A, Scomazzon SP, Newsholme P, Curi R, Homem de Bittencourt PI. The chaperone balance hypothesis: The importance of the extracellular to intracellular Hsp70 ratio to inflammation-driven Type 2 diabetes, the effect of exercise and the implications for clinical management. *Mediators of Inflammation*. 2015 ; 249205.

Kumar S, Pandey A. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*^[L]_{SEP}. 2013 ; 162750-16;

Kumaraguru K P, Rajkumar M, Trilles J P and Balasubramanian T. A note on *Lernaea cyprinacea* parasitizing the cultured Sailfin MoltyPoecilia latiprina and their control with salinity treatment. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 2006; 1(3) :284-290.

Kummer R, Fachini-Queiroz FC, Estevão-Silva CF, Grespan R, Silva EL, Bersani-Amado CA, Cuman RKN. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of ^[L]_{SEP}Citrus latifolia Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 859083-8.

Kunchandy J, Khanna S, Kulkarni SK. Effect of alpha 2 agonists clonidine, guanfacine and B-HT 920 on gastric acid secretion and ulcers in rats. Arch Int Pharmacodyn. 1985; 275: 123–138. ^[L]_{SEP}

Kupferberg S J, Catenazzi A, Lunde K, Lind A J and Palen W J. Parasitic Copepod (Lernaea cyprinacea) Outbreaks in Foothill Yellow-legged Frogs (Rana boylii) Linked to Unusually Warm Summers and Amphibian Malformations in Northern California. Copeia 3, 2009; 529–537.

Kurucz I, Morva A, Vaag A, Eriksson KF, Huang X, Groop L, Koranyi I. Decreased expression of heat shock protein 72 in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes correlates with insulin resistance. Diabetes. 2002; 51(4):1102–1109.

La Rocca V, Fonseca DV, Silva-Alves KS, Ferreira-da-Silva FW, Sousa DP, Santos PL, Quintans-Junior LJ, Leal-Cardos JH, Almeida JN. Geraniol Induces Antinociceptive Effect in Mice Evaluated in Behavioural and Electrophysiological Models. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2017 ; 120, 22–29.

Lee HB, Kim EK, Park SJ, Bang SG, Kim TG, Chung DW. Isolation and anti-inflammatory effect of astragalin synthesized by enzymatic hydrolysis of tea seed extract. J. Sci. Food Agric. 2011; 91: 2315-2321.

Leenen. P.J.M, de Bruijn MFT.R, Voerman JSA, Campbell PA, ^[L]_{SEP}van Ewijk W. Markers of mouse macrophage development detected by ^[L]_{SEP}monoclonal antibodies. J. Immunol. Meth. 1994 ; 174 : 5–19. ^[L]_{SEP}

Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia 2008 ; 51 : 216-26.

Li N, Zhou T, Fei E. Actions of Metformin in the Brain: A New Perspective of Metformin Treatments in Related Neurological Disorders. Int. J. Mol. Sci. 2022; 23 : 8281.

Li YQ, Zhou FC, Gao F, Bian JS, Shan F. Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of α -glucosidase. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2009; 57: 11463-11468. ^[L]_{SEP}

Lin LZ, Chen P, Harnly JM. New Phenolic Components and Chromatographic Profiles of Green and Fermented Teas. J. Agric. Food Chem. 2008 (b); 56 : 8130–8140.

Lin LZ, Harnly JM. A Screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. J. Agric. Food Chem. 2008 (a) ; 55 : 1084–1096.

Lindley J. Important plants used in medicine. Flora Medica. London, 1838.

Liptak JM, Hunt GB, Barrs VRD, Foster SF, Tisdall PLC, O'Brien CR, Malik R. Gastroduodenal ulceration in cats: eight cases and a review of the literature. J Fel Med Surg. 2002 ; 4 : 27–42.

Lira MHP, Andrade junior FP, Moraes FQ, Macena GS, Pereira FO, Lima IO. Antimicrobial activity of geraniol : an integrative review. Journal of essential oil research, 2020.

Litescu SC, Sandra AV, Eremia SAV, Diaconu M, Tache A, et al. Biosensors Applications on Assessment of Reactive Oxygen Species and Antioxidants. Environmental Biosensors. In Tech Rijeka Croatia. 2011.

Liu X, Cai J, Chen H, Zhong Q, Hou Y, Chen W, Chen W. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*. Microbial Pathogenesis. 2020; 141: 103980.

Llorach R, Gil-Izquierdo A, Ferreres F, Tomas Barberan FA. HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (Brassica oleracea L. var. botrytis) agroindustrial byproducts. J Agric Food Chem. 2003 ; 51: 3895-9.
[L]
[SEP]

Lukanc B, Erjavec V. Treating burns in cats and dogs using medical honey. Proceedings of Socratic Lectures. 2022; 7: 77-81.

Maas JL, Galletta GJ, Stoner GD. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries. Hortscience. 1991 ; 26 : 10.

Macedo EMA, Santos WC, Sousa Neto BP, Lopes EM, Piauilino CA, Cunha FVM, Sousa DP, Oliveira FA, Almeida FRC. Association of terpinolene and diclofenac presents antinociceptive and anti-inflammatory synergistic effects in a model of chronic inflammation. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2016 ; 49(7): e5103.
[L]
[SEP]

Magdoud O, Chabchoub I, Gara S, Toumi A, Mokni M. Apport de la dermoscopie dans une ectoparasitose rare: *Dermanyssus gallinae* [Contribution of dermoscopy in a rare ectoparasitosis: *Dermanyssus gallinae*]. Annales de dermatologie et de Vénéréologie. 2019; 146(12S): A268.
[L]
[SEP]

Mahran GH, Ahmed MS, El-Fishawy AM. A phytochemical study of *Solenostemma argel* Hayne. Growing in Egypt. Bull. Fac. Pharm. 1969 ; 8 (1) : 1.

Mahran GH, Wahba SK, Saber AH. Phytochemical study of *Solenostemma argel* ‘‘Hayne’’ leaves. Part 1 — isolation of two crystalline substances. Bull. Fac. Pharm. 1967 ; 6 (1) : 191.

Mainzen PPS, kannan KN. Protective effect of rutin on lipids, lipoproteins, lipid metabolizing enzymes and glycoproteins in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2006; 58: 1373-1383.
[L]
[SEP]

Mamani-Matsuda M, Rambert J, Malvy D, Lejoly-Boisseau H, Daulouede S, Thiolat D, Coves S, Courtois P, Vincendeau P and Mossalayi M D. Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei* gambiense and decreases the proinflammatory response of human macrophages. Antimicrob Agents Chemother. 2004 ; 48: 924–929.

Mamur S. Geraniol, a natural monoterpene, identifications of cytotoxic and genotoxic effects *in vitro*. *Journal of Essential Oil Research*. 2021, 34 (1): 54-64.

Martin MJ, La-Casa C, Alarcon LC, Cabeza J, Villegas I, Motilva, V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. *Z. Naturforsch. C J. Biosci.* 1998; 53: 82-88. [SEP]

Martinez JR, Silveira GE. Equine gastric ulcer syndrome: risk factors and therapeutic aspects. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2006 ; 27: 157-169.

Martini S, Conte A, Tagliazucchi D. Phenolic compounds profile and antioxidant properties of six sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars. *Food Research International*. 2017; 97 : 15–26.

Maruthappan V, Sakthi Shree K. Antiulcer activity of aqueous suspension of *Saraca indica* flower against gastric ulcers in albino rats. *J. Pharm. Res.* 2010; 3(1): 17-20.

Maske H, Weinges K. Untersuchungen über das Verhalten der Meerschweinchen gegenüber verschiedenen diabeto- genen Noxen. Alloxan und Dithizon. *Naunyn-Schmiede- berg's Arch exper Path Pharmacol.* 1957 ; 230 : 406–420.

Matile L. Diptères d'Europe occidentale : introduction, techniques d'étude et morphologie. Nématocères, Brachycères, Orthorraphes et Aschizes. Ed. Boubée, T1, Paris, 1993 ; 439p.

Matos MJ, Santana L, Uriarte E, Abreu O, Molina E, Yordi EG.. Coumarins -An Important Class of Phytochemicals. In: Rao, A. V. , Rao, L. G. , editors. *Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health* [Internet]. London: IntechOpen. 2014.

Matsuda H, Samukawa K and Kubo M. Anti-inflammatory activity of Ginsenoside Ro1. *J. Planta Med.* 1990; 56: 19-23.

Matsunaga T, Hasegawa C, Kawasuji T, Suzuki H, Saito H, Sagioka T, Takahashi R, Tsukamoto H, Morikawa T, Akiyama T. Isolation of the antiulcer compound in essential oil from the leaves of *Cryptomeria japonica*. *Biol. Pharm. Bull.* 2000; 23, 595–598. [SEP]

McCord J. Fridovich I. Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocuprin. *J. Biol. Chem.* 1969 ; 244 : 6049–6055.

Mead J R and McNair N. Antiparasitic activity of Flavonoids and isoFlavones against *Cryptosporidium parvum* and *Encephalitozoon intestinalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 259 :153–157.

Megha J, Versha S, Narayan G. Antioxidant and wound healing potential of *Pistia stratiotes* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2012; S579-S584.

Meshram GG, Kumar A, Rizvi W, Tripathi CD and Khan RA. Evaluation of the anti-inflammatory activity of the aqueous and ethanolic extracts of the leaves of *Albizia lebeck* in rats. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2015.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobson LB, Nichols DE, MacLaughlin JL. “Brine shrimp, a convenient general bioassay for active plant constituents”. *Planta Medica*. 1982 ; 45: 31-34.

Michael HN. Chemical investigations on the leaves of solenostemmaargel [Del.] hayne. Asian J Chem. 1998; 10:1038. [L]_{SEP}

Mirzaei[L]_{SEP} **M.** Prevalence and Histopathologic Study of Lernaea cyprinacea in Two Species of Ornamental Fish (Poecilia latipinna and Xiphophorus helleri) in Kerman, South-East Iran. Turkiye Parazit Derg. 2015; 39 :222-6.

Mischkowski D, Palacios-Barrios E, Banker L, Dildine TC, Atlas LY. Pain or nociception? Subjective experience mediates the effects of acute noxious heat on autonomic responses. Pain. 2018 ; 159 (4) :699-711.

Mohamed HE, El-Swefy SE, Hasan RA, Hasan AA. Neuroprotective effect of resveratrol in diabetic cerebral ischemic-reperfused rats through regulation of inflammatory and apoptotic events. Diabetology & Metabolic Syndrome. 2014; 6:88.

Moharram HA, Youssef MM. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. Alex. J. Fd. Sci. & Technol. 2014 ; 11(1) : 31-42.

Monagas M, Garrido I, Lebron Aguilar R, Bartolome B, Gomez Cordoves C. Almond (Prunusdulcis (Mill.) D. A. Webb) skins as a potential source of bioactive polyphenols. J Agric Food Chem. 2007; 55:8498–507. [L]_{SEP}

Morgan KN, Tromborg CT. Sources of stress in captivity. Applied Animal Behaviour Science. 2007; 102:262–302.

Mori HM, Kawanami H, Kawahata H, Aoki M. Wound healing potential of lavender oil by acceleration of granulation and wound contraction through induction of TGF- Beta in a rat model. BMC. Complement. Altern. Med. 2016; 16:144.

Morris DE, Wu L, Bolton L, Roth S.I, Ladin D.A, Mustoe TA. Acute and chronic animal models for excessive dermal scarring: quantitative studies. Plast. Reconstruct. Surg. 1997 ; 100 : 674–681. [L]_{SEP}

Mourya P, Shukla A, Rai G, Lodhi S. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of ethanolic and aqueous extracts from Ziziphus oenoplia (L) Mill on alloxan-induced diabetic rats. beni-suef university journal of basic and applied sciences. 2017 ; 6 : 1– 9.

Mubarak NSF, Winarni JCDA, Rahman DA, Hamdayani LA. Total phenolic and avonoid compounds, antioxidant and toxicity pro le of extract and fraction of Paku atai tuber (*Angiopteris ferox* Copel). Food Res. 2019; 3(6):734- 40.

Mughal MH. Linalool: A mechanistic treatise. J Nutr Food Technol. 2019; 2(1):1-5.

Mukinda J, Syce JA. Acute and chronic toxicity of aqueous extract of Artemisia afra in rodents. J. Ethnopharmacol. 2007; 112 : 138–144. [L]_{SEP}

Mulisa E, Kaleab A, Ephrem E. Evaluation of wound healing and anti- inflammatory activity of the rhizomes of Rumex abyssinicus J. (Polygonaceae) in mice. Complementary and Alternative Medicine. 2015; 15:341

Mullen GR, Oconnor M. Mites (Acari). Medical and veterinary entomology. 2019; Chapter 26, pp. 533-602.

Mulyani WRW, Sandra^[SEP] MIDS, Prabawa IPY, Lestari^[SEP] AAW, Wihandani DM, Suastika K, Saraswati MR, Manuaba IBAP. Chaperone-Based Therapeutic Target Innovation: Heat Shock Protein 70 (HSP70) for Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2020; 13 559–568

Mudawi MME, Chidrawar VR, Yassin AYA, Habeballa RS, Abd E I-wahab MF, Sulaiman MI. Analgesic Activity of *Solenostemma argel* by Modulating Pain Nociception Pathway in Mice. *World Journal of Pharmaceutical Research* 2015; 4(4):187-197.^[SEP]

Murray MJ. Disorders of the stomach. In: Bradford P Smith, editors. *Large Animal Internal Medicine*. 4 ed. Editorial Mosby. 2009 ; 695-701. ISBN978-0-323-55445-9.

MVS MK, Talluri VP, Rajagopal SV. Purification and characterization of bioactive compound from the methanolic leaf extract of *Millingtonia hortensis linn*. *Int J Pharm Bio Sci*. 2015 ; 6 : 348-58.

Nagasawa T, Tabata N, Ito Y, Nishizawa N. Suppression of early and advanced glycation by dietary water-soluble rutin derivative in diabetic rats. *Int. Congr. Ser*, 2002; 1245 : 403–405.

Nawale RB, Ganesh SM, Balaji SW. Ethanolic extract of *Amaranthus paniculatus* Linn. ameliorates diabetes-associated complications in alloxan-induced diabetic rats. *integr med res*. 2017; 6 : 41–46.

Nayak BS, Anderson M, Pinto Pereira LM. Evaluation of wound-healing potential of *Catharanthus roseus* leaf extract in rats. *Fitoterapia*. 2007; 78 : 540–544.

Nazzaro F, F. Fratianni, L. De Martino, et al., Effect of essential oils on pathogenic bacteria, *Pharmaceuticals*. 2013 ; 6 : 1451–1474.

Negreiros HA, Gonçalves de Moura K², Barreto do Nascimento MLL, Caroline do Nascimento Rodrigues D, Ferreir PMP, Braz DC, Farias MG, de Sousa Corrêa L, Pereira ARS, Santos LKB, Gonçalves JCR, Mendes AN, Carneiro da Silva FC, Cavalcant AACM, de Castro E Sousa JM. Alpha-Terpineol as Antitumor Candidate in Pre-Clinical Studies. . 2021; 21(15):2023-2031.

Nelson RW and Reusch CE. Classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *Journal of Endocrinology*. 2014 ; 222 (3) ; T1–T9.

Nerdy N, Lestari P, Sinaga JP, Ginting S, Zebua NF, Mierza V, Bakri TK. Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach.) Lethality Test of Ethanolic Extract from Green Betel (*Piper betle* Linn.) and Red Betel (*Piper crocatum* Ruiz and Pav.) through the Soxhletation Method for Cytotoxicity Test. *Open Access Maced J Med Sci*. 2021; 9(A):407-412.

Nerhagen S, Mooney CT. Canine diabetes mellitus. *Veterinary Ireland Journal*. 2017; (7) 5 : 241-244.

Niaz K, Maqbool F, Khan F, Hassan FI, Momtaz S, Abdollahi M. Comparative occurrence of diabetes in canine, feline, and few wild animals and their association with pancreatic disease and ketoacidosis with therapeutic approach, *Veterinary World*. 2018 ; 11 (4) : 410-422.

Noor El-Deen AIE, Hassan Azza, HM, Abeer Mahmoud E. Studies on Lernaecosis Affecting Cultured Golden Fish (*Carassius auratus*) and Trail for its Treatment in Earthen Ponds at Kafr El-Sheikh Governorate, Egypt. *Global Veterinaria*. 2013; 11 (5): 521-527.

OCDE. Essai n° 402: Toxicité cutanée aiguë, Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4, Éditions OCDE, Paris. 2017.

OCDE. Guidelines for testing of chemicals. Guidance n°420. Acute oral toxicity: Fixed Dose Procedure. (https://ntp.niehs.nih.gov/iccva/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl420.pdf), 2017.

Ohkawa H, Onishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1969 ; 95 : 351–358.^[1]_{SEP}

Okabe S, Pfeiffer CJ. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. *Digest Dis.* 1972 ; 7 : 619–629.

Okoli CO, Akah PA, Nwafor SV, Anisiobi AI, Ibegbunam IN, Erojikwe O. Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007 ; 109 : 219–225.

Oliveira Makson GB, Marques RB, de Santana MF, Santos ABD, Brito FA, Barreto EO, De Sousa DP, Almeida FRC, Badauê-Passos D, Antonioli AR, Quintans-Júnior LJ. a-Terpineol Reduces Mechanical Hypernociception and Inflammatory Response. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2012; 111: 120–125.

ONS (Office National des Statistiques). Wilaya de Tamanrasset : répartition de la population résidente des ménages ordinaires et collectifs, selon la commune de résidence et la dispersion. Données du recensement général de la population et de l'habitat, 2008.

Oronsky B, Caroën S, Reid T. What Exactly Is Inflammation (and What Is It Not?). *Int. J. Mol. Sci.* 2022 ; 23 : 14905.

Ozenda P. Aspects biogéographiques de la végétation des hautes chaînes. *Biogeographica* (Paris). 1997;73(4):145-79.

Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 2008 ; 245, 194–205.

Pahwa R, Goyal A, Jialal I. Chronic Inflammation. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2022. ^[1]_{SEP}

Pangarkar VG. Microdistillation, Thermomicrodistillation and Molecular Distillation Techniques. In: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre For Science And High Technology Trieste. 2008.

Parrah JD, Moulvi BA, Mohsin A.G, Makhdoomi DM, Athar H, Shahid D, Mir AQ. Gastric ulceration in dog: A review. *Vetworld*. 2013 ; 449-454.

Parveen Z, Deng Y, Saeed R, Dai MK, Ahamad W, Yu YH. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoides, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. *Yakugaku Zasshi*. 2007.

Pavela R. Acaricidal properties of extracts of some medicinal and culinary plants against *Tetranychus urticae* koch. *Plant Protection Science*. 2016; 52(1): 54-63.

Peana AT, D'Aquila PS, Chessa ML, Moretti L, Serra G, Pippia P. ()-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *European Journal of Pharmacology* 2003; 460 : 37–41.

Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, Serra G, Pippia P, and Moretti MDL. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*. 2002 ; 9: 721–726.^[1]_{SEP}

Peana AT, Graziella De Montis M, Sechi S, Sircana G, D'Aquila PS, Pippia P. Effects of linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E₂ . *European Journal of Pharmacology*. 2004 (a); 497 : 279–284.

Peana AT, Montis MG, Nieddu E, Spano MT, D'Aquila PS, Pippia P. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of ()-linalool. *European Journal of Pharmacology*. 2004 (b); 485: 165–174.

Peana AT, Moretti L. Linalool in Essential Plant Oils: Pharmacological Effects. *Botanical Medicine in Clinical practice*, 2008.

Périco LL, Emílio-Silva MT, Rodrigues ROVP, Barbosa-Filho JM,^[1]_{SEP} Rocha LRM, Batista LM, Hiruma-Lima CA. Systematic Analysis of Monoterpenes: Advances and Challenges in the Treatment of Peptic Ulcer Diseases. *Biomolecules*. 2020; 10: 265.

Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor binding of agonists and antagonists affected differentially by sodium. *Molec Pharmacol* . 1974 ; 10 : 868–879.^[1]_{SEP}

Pesin Suntar I, Kupeli AE, Yilmazer D, Baykal T, Alper M, Kırmızıbekmez H, et al. Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 127: 468-477.

Philipson JD. Phytochemistry and pharamacognosy. *Phytochemistry*. 2007 ; 68 : 2960-2972.

Pikulski M, Brodbelt JS. Differentiation of Flavonoid Glycoside Isomers by Using Metal Complexation^[1]_{SEP} and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003, 14 : 1437–1453

Ping-tao Li, Michael G, Gilbert W, Stevens D. *Asclepiadaceae*. *Flora of China*. 1995 ; 16: 189–270.

Pinheiro PF, Justino GC. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications, Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and health. 2012. ISBN: 978-953-51-0296-0.

Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem.* 2011 ; 1 : 106.

Plaza A, Bifulco G, Hamed AI, Pizza C, Piacente S. Argeloside A and B, two novel 14,15-secopregnane glycosides from *Solenostemma argel*. *Tetrahedron Letters* 44, 2003, 8553–8558.

Plaza A, Perrone A, Balestrieri ML, Felice F, Balestrieri C, Hamed Arafa I. New unusual pregnane glycosides with antiproliferative activity from *Solenostemma argel*. *Steroids.* 2005; 70:594-603. [L]
[SEP]

Plaza A, Piacente S, Perrone A, Hamed A, Pizza C, Bifulco G. Stemmosides C and D, two novel unusual pregnane glycosides from *Solenostemma argel*: structural elucidation and configurational study by a combined NMR-quantum mechanical strategy. *Tetrahedron.* 2004 ; 60 : 12201–12209.

Prabu PC, Panchapakesan S, Raj CD. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* roots in Wistar rats. *Phytother.* 2013 ; 27 : 1169–1178.

Prakash V. Terpenoids as cytotoxic compounds: A perspective. *Pharmacogn Rev.* 2018;12(24):166-76.

Pramod M, Ajay S, Gopal R, Santram L. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of ethanolic and aqueous extracts from *Ziziphus oenoplia* (L) Mill on alloxan-induced diabetic rats. *beni-suef university journal of basic and applied sciences* 6 (2017) 1– 9.

Prashar A, Locke IC, Evans CS. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation*, 2004; 37(3) : 221-229.

Quettier Deleu C. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour. *J Ethnopharmacol.* 2000; 72:35–42. [L]
[SEP]

Quintans-Júnior Lucindo J, Makson G.B, Oliveira MF, Santana MT, Santana AG, Guimarães JS, Siqueira DP, De Sousa, Reinaldo NA. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice [L]
[SEP]. *Pharmaceutical Biology*, 2011; 49(6): 583–586.

Qureshimatva U M, Maurya R R, Gamit S B, Patel R D and Solanki H A. Determination of Physico-Chemical Parameters and Water Quality Index (Wqi) of Chandlodia Lake, Ahmedabad, Gujarat, India. *J Environ Anal Toxicol.* 2015; 5: 288.

Rahmouni N, Pinto DGC, Beghidja N, Benayache S, Silva AMS. *Scabiosa stellata* L.: New insights into its phenolic profile. *Molecules,* 2018; 23:1-11.

Raj Kapoor B, Anandan R, Jayakar B. Anti-ulcer effect of *Nigella sativa* Linn. against gastric ulcers in rats. *Current Science.* 2002; 82 (2) : 177-179.

Rakieter N, Rakieter MC, Nadkarni MW. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother. Res.* 1963 ; 29 : 91–98.

Ramaiah SK. Preclinical safety assessment. Current gaps, challenges and approaches in identifying translatable biomarkers of drug- induced liver damage. Clin. Lab. Med. 2011; 31 : 161–172.

Ramalingam AR, Prasanna KP, Sathesha A, Mariappan K, Anand P, Ambasankar K, Debasis D, Karingalakkandy PJ, Shankar VA, Koyadan KV. Natural infestation of an anchor worm, *Lernaea* sp. in cage culture of Asian Seabass, *Lates calcarifer* juveniles and its control using an anti-parasitic drug, emamectin benzoate. Journal of Parasitic Diseases. 2023; 47 : 306–318.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Arch Int Pharmacodyn. 1957 ; 111 : 409–419

Rashmi HB, Negi PS. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. Food Research International. 2020 ; 136 : 109298

Rassem HHA, Abdurahman HN, Rosli MY. Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. Aust. J. Basic & Appl. Sci. 2016 ; 10 (16) : 117-127.

Reed KA. Identification of Phenolic Compounds from Peanut Skin using HPLC-MS. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Degree of Doctor of Philosophy. In Food Science and Technology. Blacksburg, Virginia, 2009.

Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. Diabet Med. 2005 ; 22 : 359–370.

Regos I, Urbanella, A, Treuller D. Identification and quantification of phenolic compounds from the forage legume sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). J. Agric. Food Chem. 2009; 57, 5843–5852.

Rengarajan S, Rani M, Kumaresapillai N. Study of ulcer protective effect of *Ipomea batatas* (L.) dietary tuberous roots (sweet potato). Iran J Pharm Ther. 2012 ; 11 : 36-39.

Rhudy JL, Williams AE, McCabe KM, Nguyễn MA TV, Rambo P . Affective modulation of nociception at spinal and supraspinal levels. Psychophysiology. 2005 ; 42 : 579–587.

Ricardou M. *Asclepiadacées*. Société d'édition scientifique, Paris, 1893.

Richardson Ennelle Durnett, Michael R. Vasko. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics. 2002 ; 302 : 839–845.

Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. Gastroenterology. 1979 ; 77 : 433–443.

Rotelli Alejandra Ester, Teresita Guardia, Américo Osvaldo Juárez, Nadir Ernesto de la Rocha, Lilian Eugenia Pelzer. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. Pharmacological Research. 2003; 48 : 601–606.

Rotermund C, Machetanz G, Fitzgerald JC. The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases. Front. Endocrinol. 2018; 9: 400.

Rozza AL, Mello Moraes T, Kushima H, Tanimoto A, Marques MOM, Bauab TM, Hiruma-Lima CA, Pellizzon CH. Gastroprotective mechanisms of Citrus lemon (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E₂. Chem. Bio. Inter. 2011; 189: 82–89.

Russell A. The natural tannins. Chem. Rev. 1935 ; 17(2) : 155–186.

Russo EB, Marcu J. Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads. Advances in Pharmacology. 2017; 80. ^[1]_{SEP}ISSN 1054-3589.

Russo R, Autore G, Severino L. Pharmaco-Toxicological Aspects of Herbal Drugs Used in Domestic Animals. Natural Product communications. 2009 ; 4(0) :1-8.

Sahki A, Sahki Boutamine R. Le Hoggar : Promenade botanique. Edition ESOPE, Lyon, 2004. ISBN : 2-903420-26-2.

Saleh DO, Kassem I and Melek FR. Analgesic activity of Gleditsia triacanthos methanolic fruit extract and its saponin-containing fraction. Pharmaceut. Biol. 2015; 54: 576-580.

Samy AH, AbeerAbd-Elhameed A, yehia AH, TarekMostafa M. Saponins and their potential role in diabetes mellitus. Diabetes Manag. 2017; 7(1) : 148–158.

Sannomiya M, Vitor B, Fonseca MA, da Silva LRM. Rocha LC. dos Santos CA, Hiruma-Lima ARM, Souza Brito W, Vilegas. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 97: 1–6.

Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2011 ; 8 :1-10. ^[1]_{SEP}

Sayyadzadeh G, Esmaeili H R, Ghasemian S, Mirghiyasi S, Parsi B, Zamanpoore M and Akhlaghi M. Co-invasion of anchor worms *Lernaea cyprinacea* (Copepoda: Lernaeidae) in some freshwater fishes of the Kor River Basin, Southwest of Iran with some remarks on the ecological aspects of lernaeosis in the country. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 2015; 15(1) :371-389.

Schieber A, Berardini N, Carle R. Identification of Flavonol and Xanthone Glycosides from Mango (*Mangifera indica* L. Cv. “Tommy Atkins”) Peels by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. J. Agric. Food Chem. 2003; 51, 5006–5011.

Schulten HR. Field Desorption and Fast Atom Bombardment^[1]_{SEP}Mass Spectrometry of Spirostanol and Furostanol Saponins from Paris polyphylla. Z. Naturforsch. 1984, 39c : 201-211.

Sengar N, Joshi A, Prasad SK, Hemalatha S. Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activities of standardized root extract of *Jasminum sambac*. J. Ethnopharmacol. 2015; 160: 140-1488.

Serafim C, Araruna ME, Alves Júnior E, Diniz M, Hiruma-Lima C, Batista L. A Review of the Role of Flavonoids in Peptic Ulcer (2010–2020). *Molecules* 2020; 25, 5431.

Shaaban HAE, El-Ghorab AH, Shibamoto T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *Journal of Essential Oil Research*. 2012 ; 24(2) : 203-212.

Shafek RE, Michael HN. Antibacterial and antioxidant activity of two new kaempferol glycosides isolated from *Solenostemma argel* stem extract. *Asian Journal of Plant Sciences*. 2012; 11(3): 143-147.

Shay H, Komarov SA, Fels SS, Meranze D, Gruenstein M, Siplet H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration. *Gastroenterology*. 1945 ; 5 : 43–61.

Shay H, Komarov SA, Fels SS, Meranze D, Gruenstein M, Siplet H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration. *Gastroenterology*. 1945; 5: 43–61.

Shivhare c, Pradeep K. Singour, U.K. Patil, R.S. Pawar. Wound healing potential of methanolic extract of *Trichosanthes dioica* Roxb (fruits) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 127: 614–619.

Sigognault Flochlay A, Thomas E, Sparagano O. Poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestation: A broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. *Parasites & Vectors*. 2017; 10: 4- 9.

Sikder K, Kesh SB, Das N, Manna K, Dey S. The high antioxidative power of quercetin (aglycone flavonoid) and its glycone (rutin) avert high cholesterol diet induced hepatotoxicity and inflammation in swiss albino mice. *Food Funct*. 2014; 5:1294. [1][SEP]

Silva FV, Fernandes HB, Oliveira IS, Viana AFSC, Costa DS, [1][SEP]Lopes MTP, Lira M, Quintans-Júnior LP, Sousa AA, Oliveira. RCM. Beta-cyclodextrin enhanced gastroprotective effect of (–)-linalool, a monoterpene present in rosewood essential oil, in gastric [1][SEP]lesion models. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 2016 ; 389(11): 1245-1251.

Silva L. A Literature Review of Inflammation and Its Relationship with the Oral Cavity. *Glob J Infect Dis Clin Res*. 2016 ; 2(1) : 001-007.

Singh AK. Hydrolytic Maceration, Expression and Cold Fat Extraction. In: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre For Science And High Technology Trieste, 2008.

Singh AP, Wang Y, Olson RM, Luthria D, Banuelos GS, Pasakdee S. LC-MS-MS analysis and the antioxidant activity of flavonoids from eggplant skins grown in organic and conventional environments. *Food Nut Sci*. 2017; 8:873-88. [1][SEP]

Sireatawong S, Lertprasertsuke N, Srisawat U, Thuppia, A, Ngaamjariyawat A, Suwannlihio N, Jaijoy K. Acute and sub-chronic toxicity study of the water extract from *Tiliacora trianora* (Colebr.) Diels in rats. *Songklanarin J. Sci. Technol*. 2008; 30 : 729–737. [1][SEP]

Sireesha B, Reddy B, Basha SK, Chandra K, Anasuya D, Bhavani M. A Review on Pharmacological Activities of Alkaloids. World Journal of Current Med and Pharm Research. 2019 ; 1(6) : 230-234

Smith AYR, Adanlawo IG. Hypoglycaemic effect of saponin from the root of *Garcinia kola* (bitter kola) on alloxan-induced diabetic rats. JDDT. 2012; 2(6) : 9–12.

Sommer D, Heffels-Redmann U, Köhler K, Lierz M, Kaleta EF. Role of the fowl poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) in the transmission of avian influenza A virus. Tierärztliche Praxis Grosstiere. 2016; 44(01): 26-33.

Souza RHL, Cardoso MSP, Menezes CT, Silva JP, De Sousa DP, Batista, JS. Gastroprotective activity of α -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. DARU. J. Pharm. Sci. 2011; 19 (4): 277 – 281.

Sparagano OAE, Giangaspero A. Parasitism in egg production systems: The role of the red mite (*Dermanyssus gallinae*). Egg chemistry, production and consumption. 2011; pp. 394-414.

St. Jean G. Amputation and prosthesis. Advances in ruminant orthopedic. Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Manhattan, Kansas. 1996; 12(1).

Steen KH, Reeh PW, Kreysel HW. Topical acetylsalicylic, salicylic acid and indomethacin suppress pain from experimental tissue acidosis in human skin. Pain. 1995; 62: 339-347.

Stephane FFY, Jules BKJ. Terpenoids as Important Bioactive Constituents of Essential Oils. In M. S. d. Oliveira, W. A. d. Costa, & S. G. Silva (Eds.), Essential Oils - Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications. 2020.

Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. J Invest Dermatol. 2007.

Stratakis ACh, Koidis A. Methods for Extracting Essential Oils. Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. 2016.

Sumbul S, Ahmad MMM. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. J Pharm Bioall Sci. 2011; 3:361-7.

Swenson JA, Patel JB, Jorgensen JH. Specific phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In Manual of Clinical Microbiology, 9th Ed. Murray PR, Baron EJ, James H. Jorgensen, Landry ML, and Pfaller MA, Washington, DC: ASM Press, 2007.

Système général harmonisé de classification et d'étiquetage des produits chimiques (SGH): dangers pour la santé et l'environnement – toxicité aiguë. 5^{ème} édition, 2013. ST/SG/AC.10/30/Rev.5

Szabo S, Trier JS, Frankel PW. Sulfhydryl compounds may mediate gastric cytoprotection. Science. 1981 ; 214 : 200–202.

Tahir MM, EL Tayeb IB, Shaddad SAI. The pharmacological actions of the aqueous extract of the leaves of *Solenostemma argel* (Hayne) on isolated rabbit aortic strip and guinea pig atria. Journal of animal and veterinary advances 2005 ; 4 (10) : 831-834.

Taj Al-Deen A, Al Nageb G. Hypoglycemic effect and *in vitro* antioxidant activity of methanolic extract from *Argel* (*Solenostemma Argel*) plant. International Journal of Herbal Medicine 2014; 2 (2): 128-131

Takagi K, Okabe S, Saziki R. A new method for production of chronic gastric ulcer in rats and the effect of several drugs on its healing. Jap J Pharmac. 1969 ; 19 : 418–426.

Talukder ME, Momen F, Barua R, Sultana S, Yesmin F, Islam MS, et al. *In vitro* assessment of cytotoxic activity of hybrid variety of *Momordica charantia* (Bitter Gourd). J Phytopharmacol. 2020; 9(6) : 445-8. [L]
[SEP]

Tandon Sudeep. Distillation Technology for Essential Oils. In: Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre For Science And High Technology Trieste, 2008.

Tarutani M, Sakuma H, Shiratsuchi K, Mieda M. Histamine H₂-receptor antagonistic action of N-3-[3-(1- piperidinyloxy)propylacetoxyacetamide hydrochloride (TZU-0460). Arzneimittel/Forsch/Drug Res. 1985 ; 35 : 703–706.

Tasaka Y, Inoue Y, Matsumoto H, Hirata Y. Changes in plasma glucagon, pancreatic polypeptide and insulin during development of alloxan diabetes mellitus in dog. Endocrinol Japon. 1988 ; 35 : 399–404.

Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S, Mahmood ZA. Analgesic and anti-inflammatory activities of piper nigrum L. Asian Pac J Trop Med. 2014; 7S1:S461-S468. [L]
[SEP]

Tavares-Dias M, Neves L R, Santos E F, Dias M K R, Marinho R G B. and Ono E A. *Perulernaea gamitanae* (Copepoda: Lernaieidae) parasitizing tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characidae) and the hybrids tambacu and tambatinga, cultured in Northern Brazil. *Colossoma macropomum*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2011; 63(4): 988-995.

Teia FKF. A review of *Solenostemma argel*: Phytochemical, pharmacological activities and agricultural applications. Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine. 2018; 4(2): 98-101.

**Teixeira MC, Lopes MJ, Sousa-Júnior DL, Ribeiro AE, Pereira BS, Aquino EP, Aquino NC, Silveira ER, Leal LK, [L]
[SEP]Viana GS.** Evaluation of the Healing Potential of Myracrodruon urundeuva in Wounds Induced in Male Rats. Rev Bras Farmacogn. 2020 ; 30 (2) : 1-10.

Tello LH. Severe burns in small animals. WSAVA- Annual Congress - Korea, 2011 by World Small Animal Veterinary [L]
[SEP]Association (WSAVA).

Temponi Vdos S, Da Silva JB, Alves MS, Ribeiro A, De Jesus Ribeiro Gomes de Pinho J, Yamamoto CH, Pinto MA, Del-Vechio-Vieira G, Vieira de Sousa OV. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Vernonia polyanthes* leaves in Rodents. Int. J. Mol. Sc. 2012; 13: 3887-3899.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnean Society. 2016 ; 161 : 105–121.

Tigani S, Ahmed S. Solenostemma argel tissue culture for production of secondary metabolites. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2009; 7(1): 19-23.

Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and extraction: A review. Internationale Pharmaceutica Scientia. 2011 ; 1(1) : 98-106.

Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. Nat Rev Neurosci. 2010 ; 11 : 823–836.

Tomlinson A, Ferguson MWJ. Wound healing. In : Methods in Molecular Biology, vol. 225: Inflammation Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2003.

Tong Z, He W, Fan X and Guo A. Biological Function of Plant Tannin and Its Application in Animal Health. Front. Vet. Sci. 2022; 8:803657.

Tsai MS, Wang YH, Lai YY, Tsou HK, Liou GG, Ko JL, et al. Kaempferol protects against propacetamol-induced acute liver injury through CYP2E1 inactivation, UGT1A1 activation, and attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice. Toxicol Lett. 2018; 290:97-109. ^[L]_{SEP}

Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J. Ethnopharmacol. 1996; 50: 27–34.

Turner. The architecture and allometry of mangrove saplings. Functional Ecology. 1996, 9: 205-212.

Udayakumar R, Sampath K, Thankaraj SM, Manoharan R, Vasudevan RA, Sei CK, Andy G, Chang WC. Hypoglycaemic and Hypolipidaemic Effects of *Withania somnifera* Root and Leaf Extracts on Alloxan-Induced Diabetic Rats. Int. J. Mol. Sci. 2009, 10, 2367-2382

Umaru IJ, Badruddin FA, Assim ZB, Umaru HA. Cytotoxicity (Brine shrimp Lethality Bioassay) of *Barringtonia racemosa* Leaves, Stem-Bark and Root Extract. Journal of Biotechnology and Bioengineering. 2018; 2(2): 45-50.

Umegaki H. Neurodegeneration in diabetes mellitus. In: neurodegenerative diseases. Landes BiosciencesSpringer. 2012; 258-265.

United States Environmental Protection Agency. 2009, 816-F-09-004.

Urku C, Onalan S. First Report of *Lernaea cyprinacea* (Copepoda: Lernaeidae) on Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) from the Sarı Mehmet Dam Lake in Van-Turkey. Eur J Biol. 2018; 77(1): 42-5.

Valgas C, De Souza SM, Smânia EFA, et al., Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, Braz. J. Microbiol. 2007 ; 38 : 369–380. ^[L]_{SEP}

Valiente MC, Chauve C, Zenner L. Experimental infection of *Salmonella enteritidis* by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology*. 2007; 146(3-4): 329-336.

Valladao G M R, Gallani S U and Pilarski F. Phytotherapy as an alternative for treating fish disease. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 2014.

Vandhana V, Mahalakshmi D, Lokeshvar R, Sujaritha J, Nandhini J. An Overview on Veterinary Herbal Medicine. *Indian Journal of Natural Sciences*. 2022 ; 13 (75) : 50724-50729.

Varani K, Rizzi A, Calò G, Bigoni R, Toth G, Guerrini R, Gessi S, Salvadori S, Borea PA, Regoli D. Pharmacology of [Tyr¹]nociceptin analogs: receptor binding and bioassay studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1999 ; 360 : 270–277.

Varela MF, Kumar S. Strategies for discovery of new molecular targets for anti-infective drugs. *Current Opinion in Pharmacology*. 2019 ; 48 : 57–68.

Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. *Malassezia* infections in humans and animals: Pathophysiology, detection, and treatment. *PLoS Pathogens*. 2015; 11(1): e1004523.

Vessal M, Hemmati M, Vasei M. (2003) Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 2003; 135: 357-364.

Vijayaraj R, Sri Kumaran N, Swarnakala.. In vivo and In vitro Models for Biological Screening of Anti-Diabetic Drugs. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences-IJPBSTM* . 2019 ; 9 (2) : 294-298.

Villeneuve DL, Landesmann B, Allavena P, Ashley N, Bal-Price A, Corsini E, Halappanavar S, Hussell T, Laskin D, Lawrence T, Nikolic-Paterson D, Pallardy M, Paine A, Pieters R, Roth R, Tschudi-Monnet F. Representing the Process of Inflammation as Key Events in Adverse Outcome Pathways. *Toxicological Sciences*. 2018; 163(2): 346–352.

Vinegar R, Schreiber W, Hugo RJ. Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 1969; 166: 96-103.

Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, McKenzie KK. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hindlimb of the rat. *Fed. Proc.* 1987; 46: 118-126.

Vino D. Antiinflammatory activity. In : *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2014.

Virdi J, Sivakami, S Shahani S, Suthar AC, Banavalikar MM, Biyani MK. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 88 : 107–111

Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Ferreira dos Anjos PM, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death and Disease*. 2018; 9:110-119.

Waghulde S, Kale MK, Patil VR. Brine Shrimp Lethality Assay of the Aqueous and Ethanolic Extracts of the Selected Species of Medicinal Plants. *Proceedings*. 2019; 41-47.

Waicheim M A, Arbetman M, Rauque C and Viozz G. The invasive parasitic copepod *Lernaea cyprinacea* updated host-list and distribution, molecular identification and infection rate in Patagonia. *Aquatic Invasion*. 2019; 14(2) : 350-364.

Wallace JL, Cirino G, de Nucci G, McKnight W, Mac- Naughton WK. *Am J Physiol* 1989 ; 256:G661–G666.

Walsh C. Where will new antibiotics come from? *Nature*. 2003 ; 1 : 65-69.

Wang J, Fang X, Ge L, Cao F, Zhao L, Wang Z, et al. Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol. *PLoS ONE*. 2018; 13(5): e0197563.

Wang J, Su B, Zhu H, Chen C, Zhao G. Protective effect of geraniol inhibits inflammatory response, oxidative stress and apoptosis in traumatic injury of the spinal cord through modulation of NF- κ B and p38 MAPK. *Experimental and therapeutic medicine* ; 2016 ; 12: 3607-3613, 2016.

Wang S, Liu L, Wang L, Hu Y, Zhang W, Liu R. Structural Characterization and Identification of Major Constituents in Jitai Tablets by High-Performance Liquid Chromatography/Diode-Array Detection Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Molecules*. 2012; 17 : 10470-10493.^[1]_{SEP}

Wang Y, Chen P, Tang C, Wang Y, Li Y and Zhang H. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *J. Ethnopharmacol*. 2015; 151: 944-950.

Wang ZW, Gu MY, Li GZ Surface properties of gleditsia saponin and synergisms of its binary system. *J. Disper. Sci. Technol*. 2005 ; 26 : 341– 347.

Waterhouse AL. Determination of total phenolics. In: Wrolstad RE. editor. *Current protocols in food analytical chemistry* Wiley. 2002; p. 461–70. ^[1]_{SEP}

Watson L, Dallwitz MJ. “The Families of Flowering Plants,” 1992.

Watts JL, Shryock TR, Apley M, Bade DJ, Brown SD, Gray JT et al. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard. 3rd Ed. CLSI document M31-A3. Clinical an Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2007 : 28.

Wenzel U and Daniel H. Early and late apoptosis events in human transformed and non-transformed colonocytes are independent on intracellular acidification. *Cell Physiol Biochem*. 2004; 14: 65–76.

WHO (World Health Organization). (3rd ed.), Guidelines for Drinking Water Quality. (1). Recommendations. 2006; 1 :491-493.^[1]_{SEP}

Who. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2014-2023. 2014. ISBN 978 92 4 250609 9.

Wink M. Fonctions and biotechnology of plantsecondary metabolites. Chapitre 1. Ann Plant Rev. 2010; 39 : 1-20.

Winter CA, Porter CC. Effect of alterations in the side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hydrocortisone esters. J. Am. Pharm. Assoc. 1962; 46: 515-519.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc Soc Exp Biol Med. 1962; 111:544–7. [1]
[SEP]

Witt CG, Will PC, Gagarella TS. Quantification of ethanol-induced gastric mucosal injury by transmission densitometry. J Pharmacol Meth. 1985 ; 13 : 109–116.

Wood JL. In: Fishman, W.H. (Ed.), . In: Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis, vol. II. Academic Press, New York. 1970 ; 61–299.

Wu C. An important player in brine shrimp lethality bioassay: The solvent. J Adv Pharm Technol Res. 2014; 5:57-8.

Wu Y, Ren D, Gao C, Li J, Du B, Wang Z, Qian S. Recent advances for alkaloids as botanical pesticides for use in organic agriculture. International Journal of Pest Management. 2021; pp. 1-11.

Ximenes RM, Lenise de Moraes N, Rodrigues Cassunde NM, Bezerra Jorge RJ, dos Santos SM, Machado Magalhaes LP, Ribeiro Silva M, de Barros Viana GS, Araújo RM, Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena K, Cavalcanti de Albuquerque JF, René Duarte M. Antinociceptive and wound healing activities of Croton adamantinus Mu ll. Arg. essential oil. J Nat Med. 2012.

Xu Q, Wang Y, Guo S, Shen Z, Wang Y, Yang L. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of Flos populi. J. Ethnopharmacol. 2014; 152: 540-5455.

Yassin NZ, Melek FR, Selim MA and Kassem IAA. Pharmacological activities of saponin containing fraction derived from Gleditsia caspica Desf methanolic fruit extract. Der Pharmacia.Let. 2013; 5: 247–253.

Yoshiki Y, Okubo K. Active oxygen scavenging activity of DDMP (2,3-dihydro-2, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one) saponin in soybean seed. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 1995 ; 59 : 1556–1557.

Younis GMA., PhD thesis, Bucharest, Romania, 1988.

Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. Nature. 2000; 407(6805) :802-809.

Zakaria ZA, Ghani ZDFA, Nor RNSRM, Gopalan HK, Sulaiman MR, Jais AMM, Somchit MN, Kader AA, Ripin J. Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic properties of an aqueous extract of Dicranopteris linearis leaves in experimental animal models. J. Nat. Med. 2008; 62: 179–187.

Zanatta L, Rosso A, Folador P, Figueiredo MS, Pizzolatti MG, Leite LD, Silva FR. Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. *J. Nat. Prod.* 2008; 71: 532–535. ^[11]_[SEP]

Zanetti M, Ternus ZR, Dalcanton F, de Mello MMJ, de Oliveira D. Microbiological Characterization of Pure Geraniol and Comparison with Bactericidal Activity of the Cinnamic Acid in Gram-Positive and Gram- Negative Bacteria. *J Microb Biochem Technol.* 2015; 7:4 186-193.

Zewdu E, Cornelius P. Antimicrobial resistance pattern of Salmonella serotypes isolated from food items and person- nel in Addis Ababa, Ethiopia. *Trop Anim Health Pro.* 2009; 41:241-249.

Zhao J, Fang F, Yu L, Wang G and Yang L. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of Croton crassifolius ethanol extract. *J. Ethnopharmacol.* 2012; 142: 367-373.

Zielinska BM, Feder-Kubis J. Monoterpenes and Their Derivatives—Recent Development in Biological and Medical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2020 ; 21: 7078.

Liens Hypertextes

Liste des liens hypertextes

[1] **PESI : Pan-European Species directories Infrastructure.** *Solenostemma argel* (en ligne). European Union : **2010**. Disponible sur : <<http://www.eu-nomen.eu> > (consulté le 1/10/2015).

[2] **Soxhlet.** https://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Soxhlet_extractor.svg > (Consulté le 19/05/2021).

[3] **Ulcère gastrique.** <http://www.gastroliege.be/infos-patients/fiche-par-pathologie/estomac/lulcere/> > (Consulté le 9/2/2021)

[4] **Étapes de formation de l'ulcère gastrique.** <https://www.classequine.com/fiches-conseils/maladies-du-cheval/estomac-cheval-anatomie-fonctionnement-pathologies/> > (Consulté le 9/2/2021)

[5] **Physiopathogénie du diabète.** <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antidiabetiques-les-points-essentiels> > (Consulté le 10/2/2021)

[6] **Carte topographique du parc national de l'Ahaggar.** <https://www.google.com/maps/place/Parc+national+culturel+de+l'Ahaggar/@23.143219,6.3933615,15z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x1220cf000864ed4d:0xc004c9d21a3cf789!8m2!3d23.1432003!4d6.411794!16s%2Fg%2F1hhzgkj53?entry=ttu> > (Consulté le 1/6/2021)

[7] **Carte topographique de Abalessa.** <https://www.google.com/maps/place/Abalessa/@22.7269823,5.9846352,14z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x12209715ef729a57:0x527628831837850b!8m2!3d22.7269444!4d6.0052778!16s%2Fg%2F1h14msry?entry=ttu> > (Consulté le 01/06/2021)

[8] **Reproduction des oiseaux.** <https://www.projetecolo.com/reproduction-des-oiseaux-479.html> > (Consulté le 20/01/2023)

[9] **Habronémose.** <https://www.esccap.fr/parasites-gastro-intestinaux-cheval/habronemose-et-draschiose-plaies-d-ete.html> > (Consulté le 10/01/2023)

Annexes

FICHE ENQUETE ETHNOBOTANIQUE

1. Localité

Région :

Département :

Village:

Altitude :

Pente Topographique:

Date de récolte:

2. Identité de l'enquêté

Nom :

Prénom :

Age :

3. Plantes et organes utilisés pour traiter une maladie précise

Nom vernaculaire :

Nom français :

Nom scientifique :

Plante entière : ☐

Feuilles : ☐

Tige : ☐

Racines : ☐

Ecorce (racine ou rameau à préciser) : ☐

Fleur : ☐

Fruit : ☐

Autres : ☐

Maux et symptômes traités par la plante ou une de ses parties :

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Extraction du principe actif

Macération : ☐

Décoction : ☐

Infusion à chaud: ☐

Calcination: ☐

Autres : ☐

5. Mode d'administration

Lavement : ☐

Boisson : ☐

Bain : ☐

Scarification : ☐

Massage : ☐

Fumigation : ☐

Instillation : ☐

Cataplasme : ☐

6. Remarques et observations

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Annexe II

Figure : Table des probits de Finney. D'après *Finney 1952*.

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Productions

Scientifiques

Productions Scientifiques

Publications scientifiques

1. "*Wound healing and antiulcer activities of Solenostemma oleifolium (Nectoux) Bullock & E.A. Bruce ex Maire essential oil in rats*" publié dans la revue *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 12 (1), 107-119, 2024.

Auteurs: Daouia K. Benmaarouf, Bernard China, Hamza Aliboudhar, Soumiya Boulahlib, Safia Zenia, Hanane Bensedira, Kheira Bouzid, Assia Slimani, Meriem H. Ben-Mahdi

2. "*In vivo acute toxicity, analgesic activity and phytochemical characterization of Solenostemma argel (Del) Hayne essential oil*" publié dans la revue *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 10(2):976-983, 2023.

Auteurs: Daouia Keltoum Benmaarouf , Bernard China , Diana C. G. A. Pinto, Hamza Aliboudhar, Soumiya Boulahlib, Safia Zenia, Hanane Bensedira, Kheira Bouzid, Meriem H. Ben-Mahdi

3. "*Effectiveness of Solenostemma argel extract on Dermanyssus gallinae in budgies (Melopsittacus undulatus)*" publié dans la revue *World's Veterinary Journal*, 13(2): 258-263, 2023.

Auteurs: Daouia K. Benmaarouf, Amina Laieb, Bernard China, Nezha Khouchane, and Meriem H. Ben-Mahdi

4. "*Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive effects of acetone extract of algerian Solenostemma argel (DELILE) Hayne leaves*" publié dans la revue *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, Vol 12, Issue 5, 2020.

Auteurs: Daouia Keltoum Benmaaroufa*, Diana C. G. A. Pintob, Bernard Chinac, Safia Zeniaa, Kheira Bouzid Bendasarid, Meriem Hind Ben-Mahdi

Manifestations Scientifiques

1. "*Effacité de l'huile essentielle de Solenostemma argel dans le traitement d'une brûlure de troisième degré chez un chat*". Deuxième Journée Scientifique Internationale "Les maladies infectieuses zoonotiques des carnivores domestiques: du diagnostic à la thérapeutique". 21 Octobre 2023. Communication affichée

Auteurs: BENMAAROUF Daouia Keltoum, LAIEB Amina, KHOUCHANE Nezha, BEN-MAHDI Meriem Hind

2. "*Effacité de l'huile essentielle de Solenostemma argel sur des escarres chez un Berger allemand*". Deuxième Journée Scientifique Internationale "Les maladies infectieuses zoonotiques des carnivores domestiques: du diagnostic à la thérapeutique". 21 Octobre 2023. Communication affichée

Auteurs: BENMAAROUF Daouia Keltoum, DJELLOUT Baya, BEN-MAHDI Meriem Hind

3. "Etude *de la toxicité aigue de l'extrait acétonique de Solenostemma argel*". 7ème Journée Nationale "Tumeurs Neuroendocrines" du 14 Mai 2023. Communication affichée

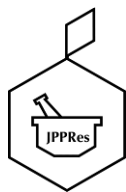
Auteurs: BENMAAROUF Daouia Keltoum, BENDISSARI Kheira, CHINA Bernard, BENSEDIRA Hanane, BEN-MAHDI Meriem Hind

4. "*Etude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait acétonique*" 7ème Journée Nationale "Tumeurs Neuroendocrines" du 14 Mai 2023. Communication affichée

Auteurs: BENMAAROUF Daouia Keltoum, BENDISSARI Kheira, CHINA Bernard, BENSEDIRA Hanane, BEN-MAHDI Meriem Hind

5. "*Etude de l'activité antalgique de l'extrait acétonique de Solenostemma argel*". 10ème Congrès Nationale de la Société Algérienne d'Evaluation et de Traitement de la Douleur (SAETD) du 8 et 9 Octobre 2015. Communication affichée

Auteurs: BENMAAROUF Daouia Keltoum, BEN-MAHDI Meriem Hind



Wound healing and antiulcer activities of *Solenostemma oleifolium* (Nectoux) Bullock & E.A.Bruce ex Maire essential oil in rats

[Actividad cicatrizante y antiulcerosa del aceite esencial de *Solenostemma oleifolium* (Nectoux) Bullock & E.A.Bruce ex Maire en ratas]

Daouia K. Benmaarouf^{1*}, Bernard China², Hamza Aliboudhar³, Soumiya Boulahlib³, Safia Zenia¹, Hanane Bensedira⁴, Kheira Bouzid⁴, Assia Slimani⁴, Meriem H. Ben-Mahdi¹

¹Unit for Evaluating the Efficacy of Pharmacological Molecules and Developing Alternative Strategies, Animal Health and Production Research Laboratory, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Algiers, Algeria.

²Sciensano, Belgian institute of Helath, Wytmanstreet 14, 1050 Brussels, Belgium.

³Organic Functional Analysis Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Science and Technology Houari Boumediene, BP 32, El Alia, Bab Ezzouar, Algiers, Algeria.

⁴Department of Pathology, Beni Messous Hospital, Algiers, Algeria.

*E-mail: d.benmaarouf@etud.ensv.dz; d.benmaarouf@gmail.com

Abstract

Context: *Solenostemma oleifolium* is a Saharan plant part of the traditional pharmacopoeia to treat wound and gastric problems. This work supports the presence of active compounds in the essential oil of *S. oleifolium*, facilitating the healing process.

Aims: To evaluate the wound healing and antiulcer effects of the essential oil of *S. oleifolium* (EOSO).

Methods: EOSO was prepared and analyzed by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS). The toxicity of the product was evaluated by an acute toxicity test and a skin toxicity test. A 1% EOSO cream was prepared and used. The percentage of wound contraction was monitored in an excision model in rats. A histopathological study was conducted on the damaged tissue throughout the experiment. For the ulcer study, two assays were performed in rats: the aspirin-induced gastric ulcer and the pyloric ligation-induced gastric ulcer assays. In the aspirin test, the ulcer index and the percentage of ulcer protection were calculated.

Results: The major compounds of the EOSO were linalool (57.1%), terpineol (12.95%), and trans-geraniol (12.66%). EOSO was not considered toxic. In the excision rat model, from day 2 to day 10, the wound contraction was significantly higher ($p < 0.05$) for the EOSO-treated wound than for the non-treated wound. In the aspirin-induced ulcer test, the ulcer index was significantly reduced in the EOSO-treated rats compared to the control rats ($p < 0.05$).

Conclusions: The present study demonstrated the wound healing and antiulcer properties of the essential oil of *S. oleifolium*.

Keywords: Algeria; volatile oils; histology; wounds and injuries; linalool.

Resumen

Contexto: *Solenostemma oleifolium* es una planta sahariana que forma parte de la farmacopea tradicional para tratar heridas y problemas gástricos. Este trabajo apoya la presencia de compuestos activos en el aceite esencial de *S. oleifolium*, facilitando el proceso de cicatrización.

Objetivos: Evaluar los efectos cicatrizantes y antiulcerosos del aceite esencial de *S. oleifolium* (EOSO).

Métodos: Se preparó EOSO y se analizó mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). La toxicidad del producto se evaluó mediante una prueba de toxicidad aguda y una prueba de toxicidad cutánea. Se preparó y utilizó una crema de EOSO al 1%. Se controló el porcentaje de contracción de la herida en un modelo de escisión en ratas. Se realizó un estudio histopatológico del tejido dañado a lo largo del experimento. Para el estudio de la úlcera, se realizaron dos ensayos en ratas: el de la úlcera gástrica inducida por aspirina y el de la úlcera gástrica inducida por ligadura pilórica. En el ensayo de la aspirina, se calcularon el índice de úlcera y el porcentaje de protección de la úlcera.

Resultados: Los principales compuestos del EOSO fueron linalol (57,1%), terpineol (12,95%) y trans-geraniol (12,66%). El EOSO no se consideró tóxico. En el modelo de rata con escisión, desde el día 2 hasta el día 10, la contracción de la herida fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en la herida tratada con EOSO que en la no tratada. En la prueba de úlcera inducida por aspirina, el índice de úlcera se redujo significativamente en las ratas tratadas con EOSO en comparación con las ratas de control ($p < 0,05$).

Conclusiones: El presente estudio demostró las propiedades cicatrizantes y antiulcerosas del aceite esencial de *S. oleifolium*.

Palabras Clave: Argelia; aceites volátiles; histología; heridas y lesiones; linalool.

ARTICLE INFO

Received: April 14, 2023.

Accepted: September 26, 2023.

Available Online: November 27, 2023.

AUTHOR INFO

ORCID: [0000-0001-7746-8400](https://orcid.org/0000-0001-7746-8400) (DB)

[0000-0001-5717-478X](https://orcid.org/0000-0001-5717-478X) (BC)

[0000-0003-3061-5543](https://orcid.org/0000-0003-3061-5543) (HA)

[0000-0001-7650-7199](https://orcid.org/0000-0001-7650-7199) (SB)

[0000-0002-2319-1001](https://orcid.org/0000-0002-2319-1001) (SZ)

[0000-0002-6132-7280](https://orcid.org/0000-0002-6132-7280) (HB)

[0000-0003-4178-8773](https://orcid.org/0000-0003-4178-8773) (KB)

[0000-0002-8031-352X](https://orcid.org/0000-0002-8031-352X) (AS)

[0000-0003-4202-5364](https://orcid.org/0000-0003-4202-5364) (MHB)

INTRODUCTION

A wound can be defined as an acute or chronic rupture of the cellular and anatomical or functional continuity of living tissues caused by internal or external factors (Teixeira et al., 2020). Wound healing is a dynamic natural process of restoring the integrity of dermal and epidermal tissues, which occurs in three interdependent and overlapping phases: the inflammatory phase, the proliferative phase, and the remodeling or epithelization phase (Gushiken et al., 2016). The wound treatment must avoid complications and achieve rapid and quality healing. Natural products are widely used in wound healing, especially essential oils, which have shown promising results in pre-clinical studies on wound healing (Gushiken et al., 2016). Gastric ulcers are a public health problem worldwide generally due to an imbalance between aggressive factors (pepsin and hydrochloric acid) and mucosa defenses, such as blood flow, mucus, and bicarbonate secretion (Souza et al., 2011). In a meta-analysis of 31 published studies, the pooled incidence of uncomplicated peptic ulcer disease (PUD) was approximately one case per 1000 person-years in the general population, and the incidence of ulcer complications was approximately 0.7 cases per 1000 person-years (Lin et al., 2011). Several factors can favor this imbalance, among which long treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), stress, the intensity of physical activity, inappropriate nutrition management, genetic predisposition, systemic disease, *Helicobacter pylori* infection, and ingestion of poison are the most important (Parrah et al., 2013). A wide range of drugs is used for peptic ulcer treatment, including histamine receptor antagonists, proton pump inhibitors and prostaglandin analogues (Sumbul et al., 2011). The undesirable effects of these drugs are numerous, hindering their proper use. Various plants are being used in complementary and alternative medicines for the management of gastric ulcers, because of their minimum toxicity and high effectiveness (Afroza et al., 2014).

Solenostemma oleifolium (Nectoux) Bullock & E.A. Bruce ex Maire is a plant belonging to the *Asclepiadaceae* family growing in the desert zones of Algeria, Libya, and Egypt (Benhouhou, 2005). The leaves of this plant are traditionally used to treat gastric and intestinal problems (Benmaarouf et al., 2020), while the juice is used for wound healing (Innocenti et al., 2005). In this context, *S. oleifolium* essential oil might be a good candidate for the treatment of wounds and ulcers in animals.

The present study aimed to chemically characterize the composition of the essential oil of *S. oleifolium*

(EOSO) and to test the wound healing and antiulcer properties of EOSO on rat models.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

The materials used were Cremophor (Sigma-Aldrich, USA), cetyl alcohol (Sigma-Aldrich, USA), paraffin oil (Sigma-Aldrich, USA), Madecassol® (Bayer, Germany), ranitidine (Sigma-Aldrich, USA).

Sampling and identification

S. oleifolium was collected in the first trimester of 2020 at Abalessa (22° 47' 13" North, 5° 31' 38" East) in the south of Algeria. The identification of the plant was carried out in the botanical department of the higher national agronomic school in Algiers (Algeria), which delivered an identification voucher deposited in the herbarium of the laboratory "Santé et production animale" of the higher national veterinary school of Algiers (SPA.031).

Extraction

Extraction of the essential oil from *S. oleifolium* leaves was conducted by hydro-distillation using a distilling device. One hundred and fifty grams of crushed leaves were put in a 1000 mL round flask and added distilled water. The mixture was hydrodistilled for 4 hours. The resulting oil was stored in an amber-sealed bottle in the refrigerator at 4°C until use. The percentages of essential oils were calculated as volume (mL) of essential oil per 100 g of plant material (v/w).

Water was eliminated by settling using anhydrous sodium sulfate.

Chromatography coupled with mass spectrometry analysis

The oil was analysed by GC/MS. The GC-MS analysis was performed using an Agilent Technologies 7890A gas chromatography interface with an Agilent 5975 C mass selective detector. Data acquisition was performed with Chem-station software. The analytical capillary column was HP5-MS (30 m × 0.25 mm i.d, 0.25 mm film thickness). The injector temperature was 250°C, the injection volume 0.2 µL, and the split ratio 1:50. The oven temperature program was 60°C for 8 min, 2°C/min to 250°C for 20 min. The temperatures of the MS source and quadrupole source were respectively 230°C and 150°C, and the impact of ionization mode was 70 eV with scan ranges of 29 to 550.

The compounds were identified based on the GC retention indices calculated from a series of alkane injected with the sample and analysed together in the same conditions and by comparing the mass spectral fragmentation patterns and their IR with those stored in the database NIST Mass spectral and Wiley Registry of Mass Spectral Data (McLafferty, 2011).

Animals

The skin tolerance and healing activity of EOSO were assessed on Wistar rats (160-180 g) of both sexes (Pasteur Institute of Algiers, Algeria). All animals were housed under standard temperature conditions ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), relative humidity ($50 \pm 1\%$), 12 hours light/ dark cycle, feeding with pellets and water *ad libitum*.

The study was authorized by the scientific council of the animal health and production research laboratory of the higher veterinary school of Algiers in accordance with the ARRIVE guidelines 2.0 (Percie du Sert et al., 2020).

Acute toxicity study

The acute oral toxicity test was performed as described previously (Benmaarouf et al., 2020) and in accordance with international guidelines (OECD, 2002). A single dose of EOSO (500, 1000, and 2000 mg/kg) was administered to fasted rats overnight, while the control group received vegetable oil (10 mL/kg). The animals were observed individually for 14 days for any behavioural and neurological changes. The number of deaths was counted.

Skin toxicity

The dermal toxicity study was performed following the guidelines of the OECD (OECD, 2017). A total of 10 healthy nulliparous, non-pregnant female rats with intact skin were used. The animals were acclimated to laboratory conditions for five days before the start of the study. The day before the test, 10% of the body surface was shaved in the back of the tested animals. A limit test dose of the 1% formulation was applied to the shaved area for 24 hours. The animals were observed for 14 days to determine any manifestation of skin toxicity and to report cases of morbidity and mortality.

Wound healing activity

Dermal cream formulation

The basic formula of the prepared cream was a semi-solid preparation of hydrophilic emulsion type (lipophilic/hydrophilic). The protocol was that of a conventional emulsion with the preparation of two

phases under agitation. The cream contained purified water, paraffin oil (18%), Cremophor® EL (6%), cetyl alcohol (5%), and EOSO (1%). The 1% concentration was based on preliminary results. The formulation was based on the recommendations of the Belgian Federal Association for Medicines and Health Products (AFMPS, 2010).

Excision wound model and wound contraction

The healing activity evaluation test, according to the circular excision wound model, was based on a planimetric study, which allows a direct quantitative evaluation by calculating the area of the wound and its evolution over time (Jha et al., 2012).

The rats were divided into three groups of six animals and fasted the day before the test. The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, intraperitoneal), and their back regions were shaved and cleaned with ethanol. A circular area of 10 mm in diameter was created in the inter-scapular region of each rat by excising the skin with a biopsy punch. Then, the rats were caged individually. The animals were treated daily: the control group received the vehicle (basic formula), the EOSO group received the 1% EOSO cream, and the standard group received a commercial cream (Madecassol 1%). The used cream amount was based on the wound surface. The idea was to cover all the surface of the wound. The cream was applied each day until healing.

The progressive development of the wounds was monitored daily by photography. In addition, the wound prints were taken on transparent papers according to the following schedule: day zero (D_0), D_2 , D_4 , D_6 , D_8 , D_{10} , D_{12} , and D_{14} . Based on the fingerprints taken, the wound areas were measured using AutoCAD software and the percentages of contraction were calculated.

Wound contraction represented the progressive changes in the planimetric wound area. The area obtained was then used to calculate the percentage of wound contraction using the following equation [1] (George et al., 2014).

$$\text{Wound contraction (\%)} = \frac{WA_{D_0} - WA_{D_n}}{WA_{D_0}} \times 100 \quad [1]$$

Where WA: wound area; D_0 : day of wounding and beginning treatment; D_n : n days after treatment.

Epithelialization period

The period of epithelialization was calculated as the time (in days) necessary for the falling of the dead tissue without any residual raw wound (Nayak et al., 2007).

Histopathology

At the end of the experimental period (D₁₄), the skin fragments from each group were removed and stored in 10% formalin for the purpose of anatomopathological studies. Once fixed, the samples were dehydrated, thinned, and then embedded in paraffin blocks. Slices (4 µm thick) were made and stained by hematoxylin-eosin (HE) and Masson's trichrome (TC) techniques. The slides were observed under an optical microscope, and the evaluation of the healing quality focused on demonstrating fibroblastic proliferation, collagen maturation, angiogenesis, and epithelialization (George et al., 2014).

Antiulcer activity

Aspirin-induced gastric ulcer

In the aspirin-induced gastric ulcer experiment (Hegde et al., 1994), three groups of 6 albino rats (150–200 g) were used. The first group was the control group receiving distilled water (10 mL/kg), the second group was the standard group receiving ranitidine (50 mg/kg), and the third group was the test group treated with EOSO (250 mg/kg), orally for 8 days. After 8 days of treatment, the animals fasted for 24 hours. The ulcer was induced by the oral administration of an aqueous solution of aspirin (200 mg/kg). The rats were sacrificed 4 hours later, and the stomach was opened to calculate the ulcer index (Kunchandy et al., 1985). The stomachs were recovered from being the subject of an anatomopathological study and examined macroscopically to highlight pathomorphological changes such as congestion, oedema, haemorrhage, and erosion.

Pyloric ligation-induced gastric ulcer

The test was performed as described previously (Shay et al., 1945). Animals fasted for 24 hours. Three groups of 6 rats were treated orally with EOSO (250 mg/kg), ranitidine (50 mg/kg), and distilled water (10 mL/kg), respectively, 30 minutes prior to pyloric ligation. After the fasting period, the rats were anesthetized with ether. The abdomen was opened by a midline incision below the xiphoid process, and the pyloric end was ligated. Ligation was performed without modification of the blood supply of the stomach. The rats were deprived of food and water during the postoperative period. Four hours after surgery, all animals were euthanized. The stomachs were opened, and the contents were collected. The volume of the gastric contents was measured and then centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes. Free acidity and total acidity were estimated by titrating 1 mL of supernatant with 0.01 N NaOH, using phenolphthalein as an

indicator. The ulcer index was calculated (Kunchandy et al., 1985). The stomachs were recovered from being the subject of an anatomopathological study and examined macroscopically to highlight pathomorphological changes such as congestion, oedema, haemorrhage, and erosion.

Statistical analysis

The statistical treatment of the data was performed using XLSTAT version 7.1 software and the IBM SPSS Statistics version 20 software. The descriptive analysis was based on the calculation of the means of the percentages of the different parameters and the graphic illustrations. All values were expressed as means ± standard deviation. The results obtained were statistically analysed by a one-factor and two-factor Analysis of Variance (ANOVA) followed by a post hoc multiple comparison test of the differences between the groups by applying the Tukey HSD test. Results were considered statistically significant if the p-value <0.05.

RESULTS

GC-MS analysis

Quantitative analysis of the composition of EOSO was performed using the GC-MS method. Table 1 illustrates the most important data of the compounds (calculated IR, identification of compounds, theoretical IR, and % GC-MS).

The extraction of EOSO by hydro-distillation yielded a very fragrant yellow oil. The yield obtained per 100 g of the plant was 0.3% (v/w). Twenty components were characterized, representing 95.44% of the total oil components detected (Table 1, Fig. S1)

Acute toxicity study

Oral administration of EOSO at doses of 500, 1000, and 2000 mg/kg body weight did not cause visible signs of toxicity in the treated rats. No neurological toxicity or changes in the behaviour were notified. A normal body weight gain was observed throughout the experimental period. Thus, EOSO was found to be non-toxic up to the dose of 2000 mg/kg body weight.

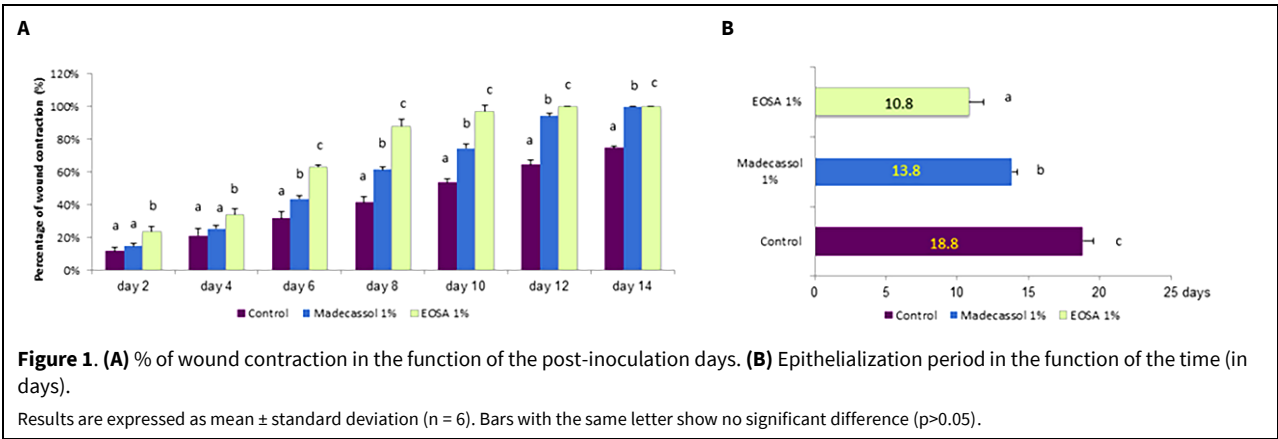
Skin toxicity

Skin toxicity symptoms such as irritation, inflammation, redness, and rash were not observed when the animals were monitored at 24, 48, and 72 hours. In addition, neither toxicity nor mortality were recorded during the 14 days of observation. Consequently, the concentration of EOSO cream tested (1%) was found to be safe.

Table 1. GCMS data from the essential oil of *Solenostemma oleifolium*.

N°	IR ^a	Compounds	IR ^b	%GCMS ^c	Identification
1	983	cis-2,6-Dimethyl-2,6-octadiene		0.126	RI, MS
2	1000	trans-2-(2-Pentenyl)furan	1007	0.326	RI, MS
3	1024	D-Limonene	1025	0.903	RI, MS
4	1035	Z-β-Ocimene	1038	0.552	RI, MS
5	1045	E-β-Ocimene	1048	0.949	RI, MS
6	1083	α-Terpinolen	1085	0.885	RI, MS
7	1106	Linalool	1103	57.103	RI, MS
8	1107	1,5,7-Octatrien-3-ol, 3,7-dimethyl-	1104	1.047	RI, MS
9	1173	Terpinene-4-ol	1174	0.245	RI, MS
10	1190	Terpineol	1189	12.954	RI, MS
11	1212	p-Menth-1-en-9-al	1232	0.430	RI, MS
12	1228	Nerol (cis-Geraniol)	1226	4.678	RI, MS
13	1257	trans-Geraniol	1258	12.658	RI, MS
14	1286	Edulan I, dihydro-	1289	0.679	RI, MS
15	1379	β-Damascenone	1382	0.487	RI, MS
16	1449	Geranyl acetone	1452	0.124	RI, MS
17	1480	β-Ionene	1483	0.184	RI, MS
18	1713	Pentadecanal	1713	0.441	RI, MS
19	1844	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	1843	0.21	RI, MS
20	1970	n-Hexadecanoic acid	1970	0.462	RI, MS
% Identification				95.443	

^aRetention indices with respect to C5–C28 n-alkanes calculated on non-polar HP5-MS capillary column. ^bRetention indices given in the literature (NIST or Wiley on non-polar HP-MS or DB5-MS capillary column). ^cPercentage calculated from the peak's areas of GC chromatogram on non-polar HP5-MS capillary column.



Wound healing activity

Wound contraction and epithelialization

In order to study the healing properties of the EOSO-based cream, the evolution of the percentages of contraction and the average surfaces of the wounds treated with EOSO 1%, the reference product

(Madecassol), and the control were recorded during a period of 14 days (Fig. 1).

On D₀, no significant difference between the mean surfaces of the treated wounds was recorded (p=1). Between D₂ and D₆, a reduction in the mean surface areas of the wounds treated locally with EOSO 1% was recorded compared to the control, with contraction percentages ranging from 23.76 to 63.13%

($p<0.0001$). However, no difference was noted between the reduction in the mean surface area of the wounds treated with Madecassol cream and that of the control group ($p=1.00$). From D₈, a significant reduction in the average surface area of the wounds treated with EOSO 1% began with reduction percentages of 88.16%, until the complete disappearance of the wounds from the eleventh day. The mean area of the wounds of the corresponding control group persisted beyond the fourteenth day, even if it gradually decreased between the eighth and the twelfth day.

Moreover, the average surface area of the wounds treated with Madecassol cream decreased moderately between the fourth and eighth days to reach a significant reduction on the twelfth day but persisted beyond the thirteenth day (Fig. 1). Wounds treated with

EOSO 1% presented the shortest period of epithelialization, followed by wounds treated with the standard Madecassol (Fig. 1).

Fig. 2 shows the evolution in the pictures of the surfaces of the control wounds, those treated with EOSO 1%, and those receiving the Madecassol standard.

Histopathology

Histopathological examination of the control wounds showed delayed healing, highlighting a hypertrophic epidermis, small cell fibroblast proliferation, deposition of collagen fibres, and angiogenesis (Fig. 3A1, A2).

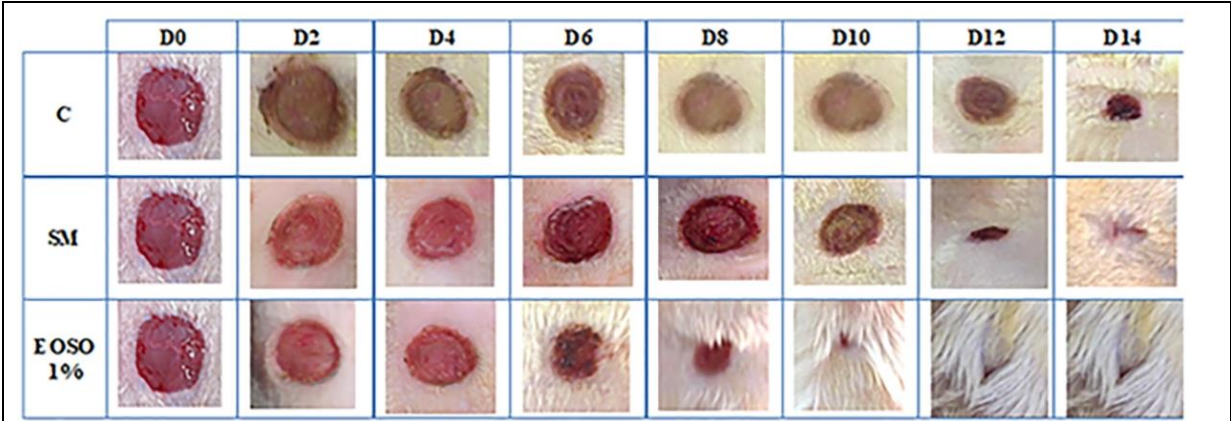


Figure 2. Evolution in images of the surfaces of the wounds during the healing activity of the *Solenostemma oleifolium* essential oil.
C: Control; SM: Standard Madecassol; Dn: n days post-treatment.

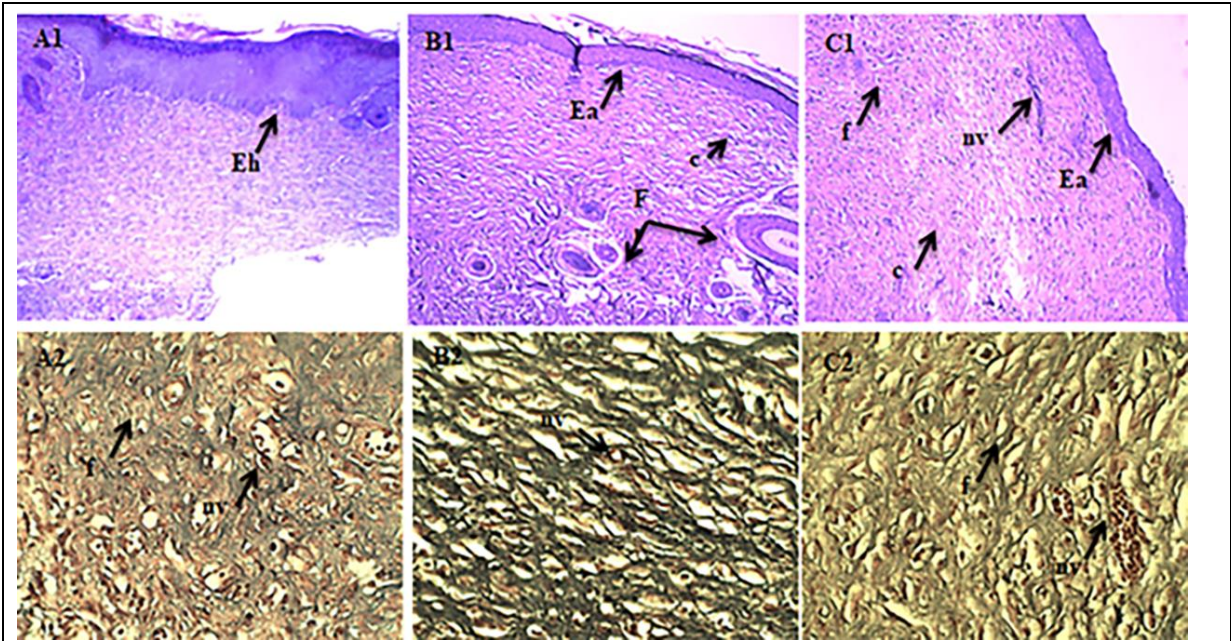
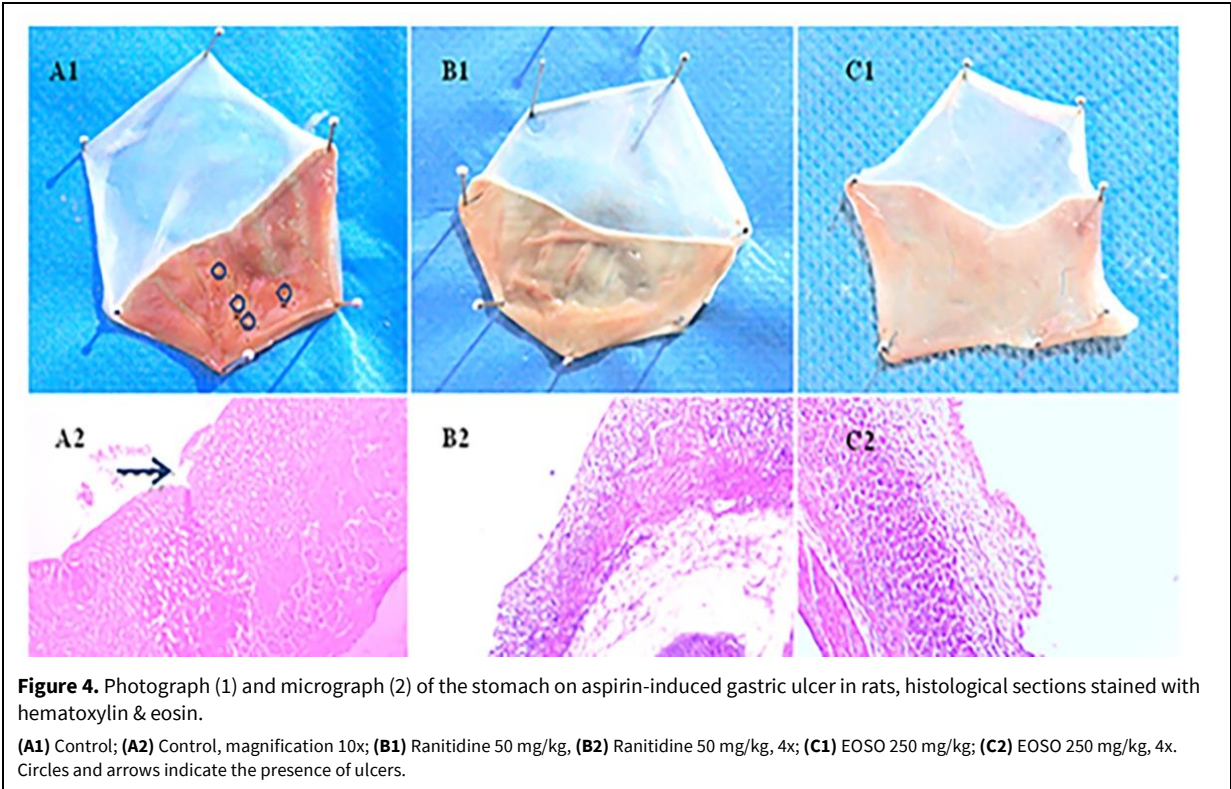


Figure 3. Micrograph of the skin, histological sections stained with hematoxylin & eosin (1) and trichrome (2).
(A1) Vehicle, magnification 10x; (A2) Vehicle, 40x; (B1) EOSO 1%, 10x; (B2) EOSO 1%, 40x; (C1) Madecassol, 10x; (C2) Madecassol 40x. (Ea) Atrophic epidermis, (Eh) Hypertrophic epidermis, (f) Fibroblast, (c) Collagen fibers, (nv) Neo-vessels, and (Fr) rudimentary hair follicles.

Table 2: Effect of essential oil of *Solenostemma oleifolium* on aspirin-induced gastric ulcer in rats.

Treatment	Dose (mg/kg bw.)	Ulcer index	% Ulcer protection
Control	NA	7.26 ± 1.44 ^a	–
Standard Ranitidine	50	2.24 ± 0.66 ^b	68.8 ^a
EOSO	250	1.03 ± 0.66 ^b	84.71 ^a

Results are indicated as mean ± standard deviation (n = 6). The numbers with the same letter in the same column show no significant difference (P > 0.05). NA: not applicable.



Furthermore, histopathological examination of the wounds treated with the cream based on EOSO 1% revealed almost complete healing with an atrophic epidermal coating and a dermal scarring area rich in collagen fibres, mature fibroblasts, and neo-vessels, as well as the formation of rudimentary hair follicles (Fig. 3B1, B2). In addition, the examination of the wounds treated with the standard drug (Madecassol) revealed an atrophic epidermal coating with a dermal area characterized by dominant fibroblastic proliferation, collagen fibres, and neovascularization (Fig. 3C1, C2).

Antiulcer activity

Aspirin-induced gastric ulcer

The results of EOSO on aspirin-induced gastric ulcers are summarized in Table 2.

EOSO exhibited a significant gastro-protective effect on aspirin-induced ulceration in rats. The oral administration of EOSO at the dose of 250 mg/kg caused a significant reduction of the ulcer index, compared to the control group ($p<0.0001$), with a percentage of ulcer protection of 84.71%. In addition, the reference drug ranitidine (50 mg/kg) resulted in a significant gastro-protective effect (68.8% inhibition) comparable to that EOSO at a dose of 250 mg/kg.

Histopathological analysis of the stomachs of the experimental rats showed the presence of ulcerations in the untreated control group, unlike the EOSO and ranitidine groups, in which no lesion was demonstrated (Fig. 4). These results confirm the recorded gastro-protective effect.

Pyloric ligation-induced gastric ulcer

The result of the gastro-protective effect of EOSO on pyloric ligation-induced gastric ulcers in rats is shown in Table 3.

Oral administration of EOSO at doses of 250 mg/kg significantly attenuated the gastric volume, free acidity, total acidity, and ulcer index ($p<0.001$), considering the control group, with a percentage of ulcer protection of 85.54%. Likewise, the antiulcer effect due to EOSO at the dose of 250 mg/kg was similar to the effect of ranitidine (50 mg/kg), with an ulcer protection rate of 79.16%.

Histological examination revealed the absence of lesions in the groups treated with EOSO and ranitidine in contrast to the untreated control group, in which lesions of ulceration and exulceration were reported (Fig. 5).

DISCUSSION

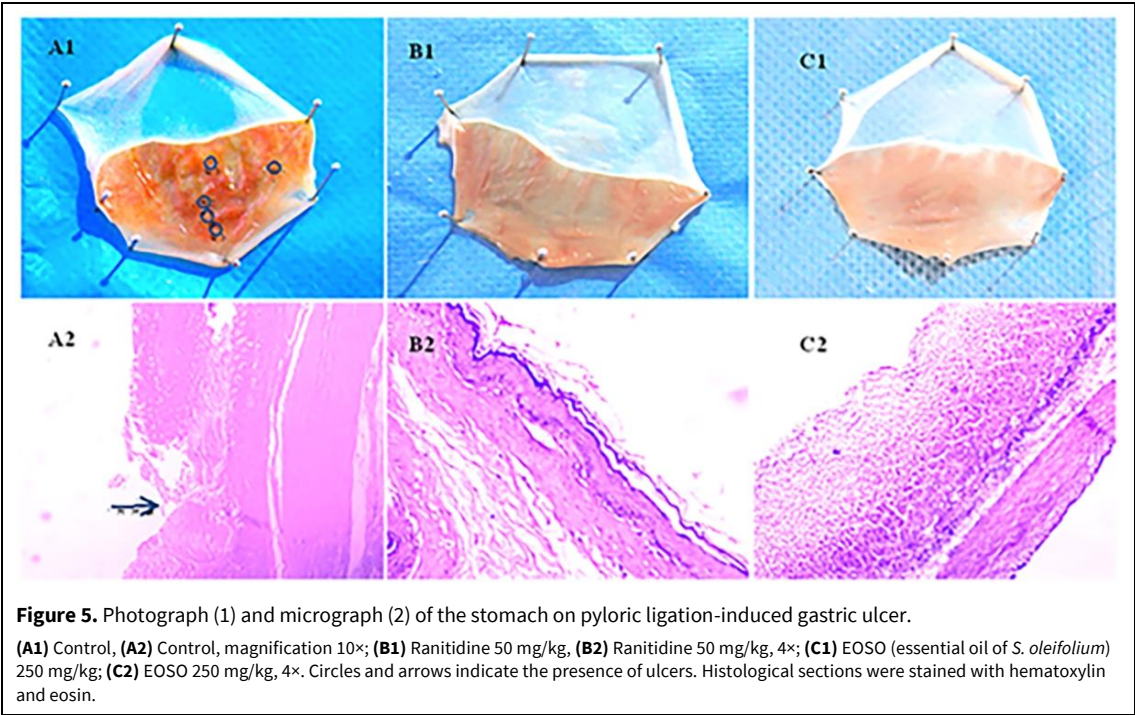
In this study, the composition, wound healing, and antiulcer effects of *S. oleifolium* essential oil were evaluated. The chemical composition of EOSO recorded in

our study is like that described previously; insofar as the two plants were harvested in the same region (Tamenrasset; Algeria) (Chikhi et al., 2019). However, the composition of EOSO from Egypt (Ibrahim et al., 2014) is different from that of Mascara (Algeria) (Chouitah et al., 2016). These differences in composition could be due to various environmental factors, including the nature of the soil, the climatic conditions, the altitude, and the plants growing nearby. Nevertheless, genetic variations can also participate in the appearance of different chemical types within the same species (Chikhi et al., 2019). Healing is the body’s natural response to an injury, and it takes place in three successive phases, some of which overlap: the vascular and inflammatory phase, the proliferative phase, and the maturation phase (formation of scar tissue) (Honrado and Murakami, 2005). During this study, the healing activity of the EOSO was tested according to the excision wound model. This model is used for the assessment of wound contraction and epithelialization (Ximenes et al., 2013). The results obtained indicate that the topical treatment of wounds with EOSO 1% cream resulted in a significant healing effect.

Table 3: Effect of essential oil of *Solenostemma oleifolium* (EOSO) on pyloric ligation-induced gastric ulcer in rats.

Treatment	Dose (mg/kg bw)	Volume of gastric juice (mL)	Free acidity (mEq/L)	Total acidity (mEq/L)	Ulcer index	Ulcer protection (%)
Control	-	6.50 ± 1.16 ^a	58.33 ± 3.22 ^a	75.43 ± 3.37 ^a	6.93 ± 1.16 ^a	-
Standard ranitidine	50	2.13 ± 0.46 ^b	12.58 ± 0.54 ^b	28.61 ± 1.37 ^b	1.48 ± 0.94 ^b	79.16 ^a
EOSO	250	2.28 ± 0.15 ^b	12.98 ± 0.88 ^b	28.98 ± 0.91 ^b	1.59 ± 1.13 ^b	77.65 ^a

Results indicated as are mean ± standard deviation (n = 6). The numbers with the same letter in the same column show no significant difference (P > 0.05).



The healing effect of EOSO 1% could be attributed to its antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, and anti-infective properties. Indeed, free radicals and oxidative reactions damage tissue and are particularly present during wound healing (Jha et al., 2012). Therefore, any substance with antioxidant activity may enhance wound healing and participate in skin reparation by destroying free radicals (Peşin Süntar et al., 2010).

EOSO is mainly composed of monoterpenes, mainly linalool, α -terpineol, and geraniol, known for their antioxidant effects. Indeed, the antioxidant effect of the essential oil of *S. oleifolium* by free radical scavenging was previously demonstrated (Chikhi et al., 2019).

On the other hand, the inflammatory process is the normal reaction of the immune system to infection and/or injury, although it has been implicated in several pathologic processes development, such as ulcers and wounds (John-Africa et al., 2014). Several components in EOSO are at the origin of their anti-inflammatory and analgesic properties. Previous studies have demonstrated the anti-inflammatory and analgesic effects of linalool (Peana et al., 2002), α -terpineol (de Oliveira et al., 2012), geraniol (Wang et al., 2016), and nerol (González-Ramírez et al., 2016). These anti-inflammatory and analgesic properties would reduce pain and oedema in wounds, thus contributing to smooth wound healing.

Numerous studies have indicated that infection can drastically reduce the healing process by involving poor granulation and tissue formation, reducing connective tissue tensile strength, and perturbing epithelialization (Mulisa et al., 2015). EOSO has antimicrobial properties thanks to the synergistic action of its several components. Indeed, the antimicrobial effect of EOSO was demonstrated in a previous study (Chouitah et al., 2016).

EOSO has a chemical composition like that of lavender essential oil with the same major component, linalool. Therefore, EOSO could have the same mechanism of action during the wound-healing process. The growth factor TGF- β is expressed in wounds treated locally with the essential oil of lavender. Indeed, TGF- β is characterized by a wide spectrum of action during the healing process and is responsible for the stimulation of angiogenesis, induction of fibroblast proliferation and their conversion into myofibroblasts, and the synthesis of type I and III collagen (Mori et al., 2016). A previous study investigated the expression of growth factors (PDGF and EGF) during the wound healing process by lavender essential oil and suggested that PDGF might cause a rapid de-

crease in granulation tissue, thus accelerating wound closure, while EGF would be responsible for a progression of re-epithelialization (Koca Kutlu et al., 2013). Furthermore, high EGF levels have been demonstrated during the healing process of acetyl acetate and ethanolic extracts of *S. argel* (Abdel-Motaal et al., 2022). Confirmation of these mechanisms of action for EOSO will be the subject of our future study.

Gastric ulcer is a widespread gastrointestinal pathology. Typically, gastric ulcers are due to a discrepancy between hostile elements and the preservation of mucosal integrity by the interne defense mechanism (Ahmed et al., 2016). The antiulcer property of EOSO was studied according to the models of the ulcer induced by aspirin and the ulcer induced by the ligation of the pylorus. Gastric injury is a major restriction to the use of NSAIDs (Maruthappan and Sakthi Shree, 2010). Synthetic NSAIDs can induce mucosal damage by impairing prostaglandin synthesis, increasing acid secretion, neutrophil infiltration, changes in nitric oxide (NO) production, generation of ROS, initiation of lipid peroxidation, and a decrease in mucus production, thus leading to bleeding ulcers (Rozza et al., 2011). In the present study, EOSO showed a significant gastroprotective effect against aspirin-induced ulcers. These results indicate that it exhibits an effective cytoprotective effect, probably by increasing the secretion of mucus and/or bicarbonate, inhibiting the formation of ulcers. Effectively, the gastroprotective effect of the mucilage fraction of this plant on gastric ulcers induced by ethanol was previously shown (El-Shiekh et al., 2021).

The effect of EOSO on gastric secretion was studied in the pyloric ligation model. In this model, autodigestion of the gastric mucosa by the overload of gastric juices, interference with gastric blood flow, and destruction of the mucosa are responsible for the induction of ulcerations (Afroza et al., 2014). In this study, EOSO clearly reduced gastric volume, free acidity, total acidity, and ulcer index, thus preventing ulcer formation. These results suggest its anti-secretory activity.

Plant extracts constitute valuable sources for the development of new therapeutic molecules. These extracts showed interesting results against gastric ulcer pathology (Sannomiya et al., 2005). It has been demonstrated that certain monoterpenes present in essential oils of plant origin have gastroprotective effects against different ulcerogenic agents (de Carvalho et al., 2014). EOSO is mainly composed of monoterpenes. Its gastroprotective activity might be due to the synergy of different compounds of the oil, such

as linalool, geraniol, nerol, α -terpineol, terpinen-4-ol, and limonene.

The protective effect of EOSO can be partly due to its main compound, linalool. Indeed, the antioxidant and anti-inflammatory actions of linalool could prevent injuries due to aggressive factors. The gastroprotective activity of linalool is likely related to its antioxidant activity. Indeed, linalool significantly reduced lipid peroxidation, suggesting that it acts as a reactive oxygen species scavenger (da Silva et al., 2016).

The presence of geraniol in the composition of EOSO may also contribute to its gastroprotective effect. Indeed, geraniol increases the liberation of antioxidant substances and maintains the levels of PGE₂ and NO, contributing to the maintenance of gastric microcirculation (Périco et al., 2020). Geraniol also activates GABA-A and TRPV-1 receptors, thereby increasing the production of CGRP, which works by increasing the mucosal blood flow, the mucus production, and the intracellular pH of the stomach mucosa (Périco et al., 2020; Wang et al., 2016). Similarly, a beneficial effect of nerol after induction of gastric ulcer involving protection against gastric damage and modulation of the immunological system was shown, suggesting the gastroprotective potential of this monoterpene (González-Ramírez et al., 2016).

Furthermore, the α -terpineol present in EOSO could contribute to the gastroprotective effect. Indeed, a previous study indicated a substantial gastroprotective action against NSAIDs in experimental models (Souza et al., 2011). The gastroprotective actions of α -terpineol may include cytoprotective processes (Souza et al., 2011). Finally, the limonene present in EOSO can also participate in canceling the side effects of NSAIDs and thus prevent the formation of lesions via the establishment of a protective coat, increasing the integrity of the mucosa (Rozza et al., 2011).

In this study, EOSO recorded a remarkable anti-secretory effect by decreasing gastric volume and stomach acidity. According to the literature, the monoterpene components mentioned above would not have an anti-secretory effect (de Assis Oliveira et al., 2014). Therefore, the anti-secretory activity recorded could be secondary to the healing of the ulcer. Indeed, the anti-secretory effect of geraniol secondary to ulcer healing or an effect on the autoregulation of gastrin release was previously demonstrated in rats (Bhattamisra et al., 2019). However, the terpinene-4-ol from EOSO could participate in the anti-secretory effect. The anti-secretory effect of terpinen-4-ol present in the essential oil of *Cryptomeria japonica* during ulcers induced by several mediators was demonstrated (Matsunaga et al., 2000).

CONCLUSION

This work demonstrated the wound healing and the antiulcer properties of *S. oleifolium* essential oil. Future studies should focus on the mechanism of action of this oil during healing and gastroprotection processes.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Kris Vernelen for the critical reading of the manuscript. This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

- Abdel-Motaal FF, Maher ZM, Ibrahim SF, El-Mleeh A, Behery M, Metwally AA (2022) Comparative studies on the antioxidant, antifungal, and wound healing activities of *Solenostemma argel* ethyl acetate and methanolic extracts. Appl Sci 12(9): 4121. <https://doi.org/10.3390/app12094121>
- AFMPS - Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé (Belgique) (2010) Formulaire thérapeutique magistral. Edition 2010. Brussels. https://www.fagg-afmps.be/sites/default/files/downloads/FTM_Pharmaciens_Edition_2010.pdf [Consulted 20 February 2023].
- Afroza B, Iswar H, Jaikumar S, Akila KP, Shefeer KA (2014) Anti-ulcer activity of polyherbal formulation-RO12 on experimentally induced ulcer in rats. Int J Phytopharmacol 5(6): 406–410. <http://doi.org/10.21276/ijp>
- Ahmed MW, Roshan S, Mahammed NL, Muqem Nasir MA (2016) Antiulcer effect of *Nigella sativa* Linn. against gastric ulcers in rats. Int J Res Dev Pharm Life Sci 5: 2006–2009.
- Benhouhou S (2005) *Solenostemma argel* (Del.) Hayne. In: A guide to medicinal plants in North Africa. Centre for Mediterranean Cooperation, International IU CN. <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/2005-093.pdf>
- Benmaarouf DK, Pinto DC, China B, Zenia S, Bendesari KB, Ben-Mahdi MH (2020) Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive effects of acetone extract of Algerian *Solenostemma argel* (Delile) Hayne leaves. Int J Curr Pharm Res 12(5): 72–81. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2020v12i5.39771>
- Bhattamisra SK, Yean Yan VL, Koh Lee C, Hui Kuean C, Candasamy M, Liew YK, Sahub PS (2019) Protective activity of geraniol against acetic acid and *Helicobacter pylori*-induced gastric ulcers in rats. J Tradit Complement Med 9(3): 206–214. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.05.001>
- Chikhi I, Dergal F, Gana DM, Dib MEA, Chaker H (2019) Chemical composition and antioxidant activity of *Solenostemma oleifolium* essential oil from Southern Algeria. J Appl Biotechnol Rep 6(2): 50–54. <https://doi.org/10.29252/jabr.06.02.02>
- Chouitah O, Meddah B, Aoues A, Sonnet P (2016) Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Solenostemma argel*. Int J Biosci 9(6): 360–365. <https://doi.org/10.12692/ijb/9.6.360-365>
- da Silva FV, de Barros Fernandes H, Oliveira IS, Viana AF, da Costa DS, Lopes MT, Lira M, Quintans-Júnior LP, Sousa AA, Oliveira RCM (2016) Beta-cyclodextrin enhanced

- gastroprotective effect of (-)-linalool, a monoterpene present in rosewood essential oil, in gastric lesion models. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 389(11): 1245–1251. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1298-3>
- de Assis Oliveira F, Andrade LN, de Sousa EB, de Sousa DP (2014) Antiulcer activity of essential oil constituents. *Molecules* 19(5): 5717–5747. <https://doi.org/10.3390/molecules19055717>
- de Carvalho KI, Bonamin F, Dos Santos RC, Périco LL, Beserra FP, de Sousa DP, Filho JMB, Rocha LRM, Hiruma-Lima CA (2014) Geraniol-a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 387(4): 355–365. <http://doi.org/10.1007/s00210-013-0947-z>
- de Oliveira MG, Marques RB, de Santana MF, Santos AB, Brito FA, Barreto EO, Damião PS, Fernanda RCA, Badauê-Passos Jr, Ângelo RA, Quintans-Júnior JL (2012) α -terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 111(2): 120–125. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2012.00875.x>
- El-Shiekh RA, Salama A, Al-Mokaddem AK, Abdel-Sattar EA (2021) Gastroprotective effect of mucilage fraction from *Solenostemma argel* via cytoprotection and attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *J Herbmed Pharmacol* 10(2): 232–240. <https://doi.org/10.34172/jhp.2021.26>
- George BP, Parimelazhagan T, Chandran R (2014) Anti-inflammatory and wound healing properties of *Rubus fairholmianus* Gard. root—an *in vivo* study. *Ind Crops Prod* 54: 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.01.037>
- González-Ramírez AE, González-Trujano ME, Orozco-Suárez SA, Alvarado-Vásquez N, López-Muñoz FJ (2016) Nerol alleviates pathologic markers in the oxazolone-induced colitis model. *Eur J Pharmacol* 776: 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.02.036>
- Gushiken LFS, Rozza AL, Vieira AJ, Beserra FP, Pellizzon CH (2016) Essential oils and their use in skin wound healing. In: Gupta VK, ed. *Natural Products: Research Reviews*. 1st ed. Vol 3. New Delhi: Daya Publishing House, pp. 501–513.
- Hegde DA, Khosa RL, Goel RK (1994) Antiulcer and cytoprotective action of *Wedelia calendulacea* Less. *Anc Sci Life* 14(1-2): 77–81. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3336508/>
- Honrado CP, Murakami CS (2005) Wound healing and physiology of skin flaps. *Facial Plast Surg Clin North Am* 13(2): 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2004.11.007>
- Ibrahim ME, Ahmed SS, El-Sawi SA, Khalid KA (2014) Investigation of essential oil extracted from *Solenostemma argel* (Dellile) Hayne. *J Essent Oil Bear Plants* 17(4): 629–632. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2014.892842>
- Innocenti G, Dall'acqua S, Sosa S, Altinier G, Della Loggia R (2005) Topical anti-inflammatory activity of *Solenostemma argel* leaves. *J Ethnopharmacol* 102(2): 307–310. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.007>
- Jha M, Sharma V, Ganesh N (2012) Antioxidant and wound healing potential of *Pistia stratiotes* L. *Asian Pac J Trop Dis* 2 Suppl 2: S579–S584. [https://doi.org/10.1016/s2222-1808\(12\)60225-4](https://doi.org/10.1016/s2222-1808(12)60225-4)
- John-Africa LB, Yahaya TA, Isimi CY (2014) Antiulcer and wound healing activities of *Sida corymbosa* in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 11(1): 87–92. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v11i1.12>
- Koca Kutlu A, Çeçen D, Gürgeç SG, Sayın O, Cetin F (2013) A comparison study of growth factor expression following treatment with transcutaneous electrical nerve stimulation, saline solution, povidone-iodine, and lavender oil in wounds healing. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 361832. <https://doi.org/10.1155/2013/361832>
- Kunchandy J, Khanna S, Kulkarni SK (1985) Effect of α 2 agonists clonidine, guanfacine and B-HT 920 on gastric acid secretion and ulcers in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 275: 123–138. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2862848/>
- Lin KJ, García Rodríguez LA, Hernández-Díaz S (2011) Systematic review of peptic ulcer disease incidence rates: Do studies without validation provide reliable estimates? *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 20(7): 718–728. <https://doi.org/10.1002/pds.2153>
- McLafferty FW (2011) Wiley Registry 9th edition/NIST 2011 Mass Spectral library (upgrade) DVD ROM, Hoboken, USA: Wiley editions.
- Maruthappan V, Sakthi Shree K (2010) Antiulcer activity of aqueous suspension of *Saraca indica* flower against gastric ulcers in albino rats. *J Pharm Res* 3: 17–20.
- Matsunaga T, Hasegawa C, Kawasuji T, Suzuki H, Saito H, Sagioka T, Takahashi R, Tsukamoto H, Morikawa T, Akiyama T (2000) Isolation of the antiulcer compound in essential oil from the leaves of *Cryptomeria japonica*. *Biol Pharm Bull* 23: 595–598. <https://doi.org/10.1248/bpb.23.595>
- Mori HM, Kawanami H, Kawahata H, Aoki M (2016) Wound healing potential of lavender oil by acceleration of granulation and wound contraction through induction of TGF- β in a rat model. *BMC Complement Altern Med* 16: 144. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1128-7>
- Mulisa E, Asres K, Engidawork E (2015) Evaluation of wound healing and anti-inflammatory activity of the rhizomes of *Rumex abyssinicus* J. (Polygonaceae) in mice. *BMC Complement Altern Med* 15: 341. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0878-y>
- Nayak BS, Anderson M, Pinto Pereira LM (2007) Evaluation of wound-healing potential of *Catharanthus roseus* leaf extract in rats. *Fitoterapia* 78(7-8): 540–544. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.06.008>
- OECD (2002) Test No. 420: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264070585-en>
- OECD (2017) Test No. 402: Acute Dermal Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>
- Parrah JD, Moulvi BA, Gazi MA, Makhdoomi DM, Athar H, Hussain Dar S, Mir AQ (2013) Gastric ulceration in dog: A review. *Vet World* 6(7): 449–454. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2013.449-454>
- Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, Serra G, Pippia P, Moretti MD (2002) Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine* 9(8): 721–726. <https://doi.org/10.1078/094471102321621322>
- Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ (2020) Reporting animal research: explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol* 18(7): e3000411. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000411>
- Périco LL, Emílio-Silva MT, Ohara R, Rodrigues VP, Bueno G, Barbosa-Filho JM, Rocha LRM, Batista LM, Hiruma-Lima CA (2020) Systematic analysis of monoterpenes: Advances and challenges in the treatment of peptic ulcer diseases. *Biomolecules* 10(2): 265. <https://doi.org/10.3390/biom10020265>
- Peşin Süntar I, Küpeli Akkol E, Yilmazer D, Baykal T, Kirmizibekmez H, Alper M, Kirmizibekmez H (2010) Investigations on the *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol* 127(2): 468–477. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.011>
- Rozza AL, de Mello Moraes T, Kushima H, Tanimoto A, Marques MO, Bauab TM, Hiruma-Lima CA, Pellizzon CH (2011)

Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E₂. *Chem Biol Interact* 189(1-2): 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.09.031>

Sannomiya M, Fonseca VB, da Silva MA, Rocha LR, Dos Santos LC, Hiruma-Lima CA, Souza Brito W, Vilegas (2005) Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *J Ethnopharmacol* 97(1): 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.053>

Shay H, Komarov SA, Fels SS, Meranze D, Gruenstein M, Siplet H (1945) A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology* 5(4): 43–61.

Souza R, Cardoso M, Menezes C, Silva J, De Sousa D, Batista J (2011) Gastroprotective activity of α -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. *Daru* 19: 277–281. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3304384/>

Sumbul S, Ahmad M, Asif M, Akhtar M (2011) Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. *J Pharm Bioallied Sci* 3(3): 361–367. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.84437>

Teixeira MC, Lopes MJ, de Sousa-Júnior DL, Ribeiro AE, Pereira BS, de Aquino PE, Aquino NC, Silveira ER, Leal LK, Viana GS (2020) Evaluation of the healing potential of *Myracrodruon urundeuva* in wounds induced in male rats. *Rev Bras Farmacogn* 30(2): 214–223. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00025-5>

Wang J, Su B, Zhu H, Chen C, Zhao G (2016) Protective effect of geraniol inhibits inflammatory response, oxidative stress and apoptosis in traumatic injury of the spinal cord through modulation of NF- κ B and p38 MAPK. *Exp Ther Med* 12(6): 3607–3613. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3850>

Ximenes RM, de Moraes Nogueira L, Cassundé NM, Jorge RJ, dos Santos SM, Magalhães LP, Silva MR, Viana GSB, Araujo RM, Sena KXFR, Albuquerque JFC, Martins RD (2013) Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil. *J Nat Med* 67(4): 758–764. <https://doi.org/10.1007/s11418-012-0740-1>

AUTHOR CONTRIBUTION:

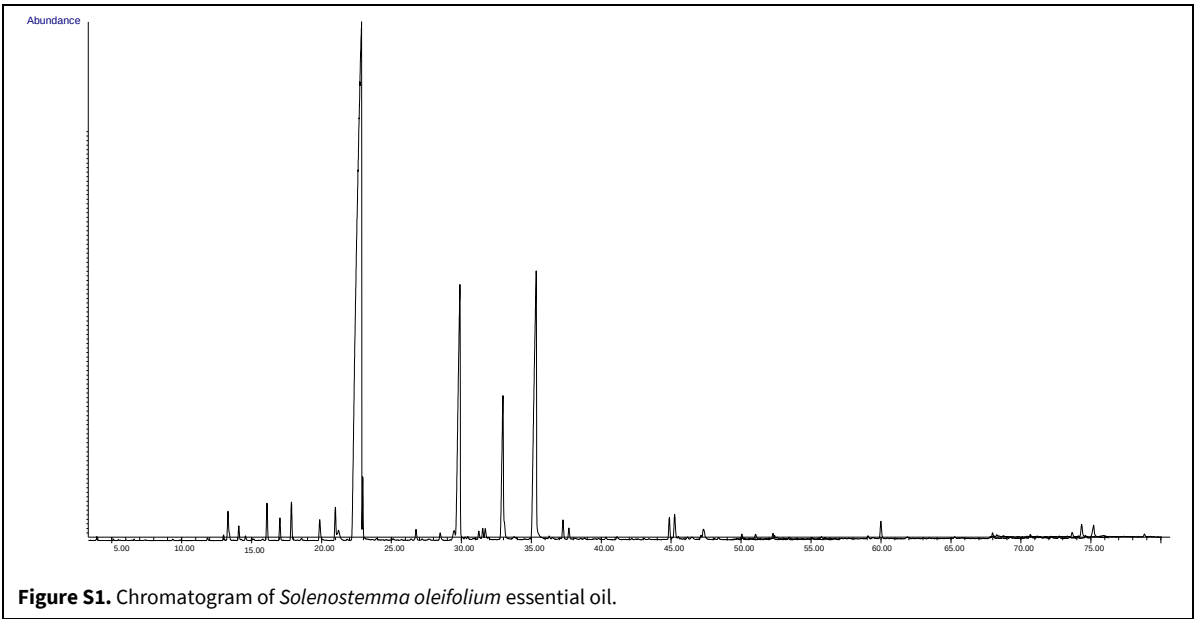
Contribution	Benmaarouf D	China B	Aliboudhar H	Boulahlib S	Zenia S	Bensedira H	Bouزيد K	Slimani A	Ben-Mahdi M
Concepts or ideas	x								
Design	x								
Definition of intellectual content	x	x							x
Literature search	x								
Experimental studies	x		x	x		x	x	x	
Data acquisition	x		x	x		x	x	x	
Data analysis	x				x		x	x	
Statistical analysis					x				
Manuscript preparation	x	x							
Manuscript editing	x	x							
Manuscript review	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Citation Format: Benmaarouf D, China B, Aliboudhar H, Boulahlib S, Zenia S, Bensedira H, Bouزيد K, Slimani A, Ben-Mahdi M (2024) Wound healing and antiulcer activities of *Solenostemma oleifolium* (Nectoux) Bullock & E.A.Bruce ex Maire essential oil in rats. *J Pharm Pharmacogn Res* 12(1): 107–119. https://doi.org/10.56499/jppres23.1660_12.1.107

Publisher’s Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Open Access: This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits use, duplication, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license and indicate if changes were made.

Supplementary data





In vivo Acute Toxicity, Analgesic Activity and Phytochemical Characterization of *Solenostemma argel* (Del) Hayne Essential Oil

Daouia Keltoum Benmaarouf ^{1*}, Bernard China ², Diana C. G. A. Pinto ³, Hamza Aliboudhar ⁴, Soumiya Boulahlib ⁴, Safia Zenia ¹, Hanane Bensedira ⁵, Kheira Bouzid ⁵, Meriem H. Ben-Mahdi ¹

¹ Unit for Evaluating the Efficacy of Pharmacological Molecules and Developing Alternative Strategies, Animal Health and Production Research Laboratory, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Algiers, Algeria

² Sciensano, Belgian Institute of Health, Wylmanstreet 14, 1050 Brussels, Belgium

³ LAQV-REQUIMTE & Department of Chemistry, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

⁴ Organic Functional Analysis Laboratory, Faculty of Chemistry, University of Science and Technology Houari Boumediene, BP 32, El Alia, Bab Ezzouar, 16111 Algiers, Algeria

⁵ Department of Pathology, Beni Messous Hospital, Algiers, Algeria

Corresponding Author: Daouia Keltoum Benmaarouf, PhD, Unit for Evaluating the Efficacy of Pharmacological Molecules and Developing Alternative Strategies, Animal Health and Production Research Laboratory, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Algiers, Algeria. Tel: +21321988600, E-mail: d.benmaarouf@gmail.com

Received February 14, 2023; Accepted May 22, 2023; Online Published June 18, 2023

Abstract

Introduction: *Solenostemma argel* is a Saharan plant used in traditional medicine to cure pain. The present work investigated the quantitative analysis of the composition of the essential oil of *S. argel*/leaves (EOSA) as well as its acute toxicity and anti-nociceptive activity.

Materials and Methods: The chemical characterization of EOSA was carried out by GC-MS and NMR. EOSA acute oral toxicity study was performed according to the OECD-420 method. EOSA anti-nociceptive activities were evaluated by acetic acid-induced abdominal writhing test, hot plate test, and formalin test.

Results: Twenty components were identified by GC-MS including Linanool (57.10%), terpineol (12.95%), trans-geraniol (12.65%), and nerol (4.67%). The main compound linalool was isolated by NMR. The EOSA at 250 and 400 mg/kg significantly attenuated acetic acid-induced writhing by 72.71 and 92.41%, respectively. Moreover, Ingestion of EOSA at doses of 250 and 400 mg/kg caused a significant and dose-dependent anti-nociceptive effect in both neurogenic and inflammatory phases of formalin-induced licking. EOSA impacts the pain latency in the hot plate test.

Conclusions: The results of this study showed that EOSA has an anti-nociceptive effect on central and peripheral pain.

Keywords: GC-MS, NMR, Acute Toxicity, Analgesic, *Solenostemma argel*

Citation: Benmaarouf DK, China B, Pinto DCGA, Aliboudhar H, Boulahlib S, Zenia S, et al. *In vivo* Acute Toxicity, Analgesic Activity and Phytochemical Characterization of *Solenostemma argel* (Del) Hayne Essential Oil. J Appl Biotechnol Rep. 2023;10(2):976-983. doi: 10.30491/JABR.2023.385652.1606

Introduction

Pain is one of the most widespread and important health problems due to its prevalence and the disability it can induce. The main role of pain is the protection of the organism against stimuli capable of damaging tissues through the activation of reflex mechanisms of spinal withdrawal.¹ Indeed, acute pain serves as an alarm and has the merit of protecting the body against harmful stimuli, while chronic pain can be a harbinger of inflammatory diseases or tissue damage such as nerve damage in the case of neuropathic pain.²

Analgesic drugs are amply used for the treatment of pain. However, their overuse leads to side effects particularly liver and kidney damage, gastrointestinal disorders, addiction, and respiratory discomfort. Recently, many natural products from medicinal plants were shown as effective and safe for

the treatment of various diseases with pain.³ In the search for new active molecules against pain, essential oils can represent an interesting source thanks to their richness in active components.

S. argel is a Saharan plant growing in the desert zones of Algeria, Libya, and Egypt.^{4,5} In southern Algeria it is one of the most used plants in traditional medicine by the Hoggar people to treat various symptoms including pain.⁶ The aerial parts of *S. argel* have been used traditionally in different preparations for the treatment of pain related to stomach ache, kidney pain,⁷ neuralgia, sciatica,⁸ and rheumatism.⁵ Effectively, in our precedent study, we proved the effectiveness of acetone extract from the leaves of *S. argel* on peripheral and central pain.⁶ Another study carried out by Mudawi and collaborators also demonstrated the analgesic

effect of the aqueous extract of *S. argel* on a mouse model.⁹

This study was undertaken with the aim of highlighting for the first time the analgesic effect of the essential oil of *S. argel* (EOSA).

Materials and Methods

Chemicals and Drugs

Acetic acid, formalin, the standard drugs indomethacin, and morphine sulphate were purchased from Sigma Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA).

Plant

S. argel was collected in January 2021 at Abalessa, Tamanrasset (22° 47' 13" North, 5° 31' 38" East) - Algeria. The plants were dried at room temperature, in a dry and aerated place. The identification of the studied plant was carried out by the botanical department of the "Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie" (ENSA) in Algiers, Algeria and they delivered us a certificate of identification. Voucher specimens were deposited in the herbarium of "Santé et Productions Animales" Laboratory of the "Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire" of Algiers (SPA.031).

Extraction of the Essential Oil

Extraction of the essential oil of *S. argel* was performed by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus. One hundred and fifty grams of crushed leaves are put in a 1000 ml round flask and then distilled water added to the leaves. The mixture is hydrodistilled for 4 h. The resulting oil was stored in an amber bottle at 4 °C until use. The percentages of EOSA were calculated as volume (ml) of EOSA per 100 g of *S. argel* leaves (v/w).

GC-MS Analysis

EOSA was analysed by GC-MS. The GC-MS analysis was carried out using an Agilent Technologies 7890A series gas chromatography interface with Agilent 5975 C mass selective detector. Instrument and data acquisition performed with Chem-station software (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA).

The analytical capillary column was HP5-MS (30 m × 0.25 mm i.d, 0.25 mm film thickness). The injector temperature was 250 °C and injection volume was 0.2 µl and the split ratio 1:50. The over-temperature program was 60 °C for 8 min, 2 °C/min to 250 °C for 20 min. The temperature of the MS source and quadrupole source was respectively 230 °C and 150 °C, impact of the ionization mode was 70 eV and over a scan range of 29-550.

Identification of compounds was carried out based on the GC retention indices calculated from a series of alkanes injected under the same conditions with the sample, and by comparing the mass spectra with those of the Wiley 7 NIST 2006 library. The percentage of EOSA compounds was

calculated from the GC peak areas.

NMR Analysis

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) (300.13 MHz for ¹H and 75.47 MHz for ¹³C). Tetramethylsilane (TMS) was used as the internal standard. The chemical shifts (δ, ppm) described for each compound were obtained at room temperature in a solution of deuterated chloroform (CDCl₃).

Unequivocal ¹³C NMR assignments were made with the aid of 2D gHSQC and gHMBC (delays for one-bond and long-range J C/H couplings were optimised for 145 and 7 Hz, respectively) experiments.

Animals

Healthy Wistar albino rats (150-200 g) and Swiss albino mice (20-30 g) of both sexes (Institute Pastor of Algiers, Algeria). All animals were housed in an animal room under standard laboratory conditions of temperature (25 ± 2 °C), relative humidity (55 ± 1%), 12 h light/dark cycle, and fed with standard pelleted food and water ad libitum. The study was permitted by the scientific council of "Santé et Productions Animales" Research Laboratory of the Higher Veterinary School of Algiers, in accordance with the ARRIVE guidelines 2.0.¹⁰

Acute Toxicity Study

An acute oral toxicity study was performed following the guidelines of the Organization for Economic Co-operation and Development.¹¹ Nulliparous and non-pregnant healthy female rats were used for this study. The rats were divided into three groups with five animals in each group. A single dose of the essential oil of *S. argel* (EOSA) (500, 1000, and 2000 mg/kg) was administered to overnight fasted rats, while the control group received vegetable oil (10 ml/kg). Animals were observed individually during the entire experimental period, for any behavioural and neurological changes as a sign of acute toxicity. For 14 days, the animals were weighed, and the number of deaths was considered. On the 14th day, blood samples are taken to analyse some biochemical parameters including urea, creatinine, AST, ALT, alkaline phosphatase, total protein, and albumin. Then, the rats were sacrificed, dissected and different organs (hearts, livers, kidneys, lungs, and spleens) were histologically analysed.

Analgesic Activity

Writhing Test in Mice

The assay was performed according to the previously described.^{6,12} Briefly, the nociceptive effect caused by the injection of acetic acid was detected by observing abdominal writhing associated with stretching of the whole body. Four

groups of 6 mice each were treated with EOSA (250 and 400 mg/kg, p.o.), indomethacin (10 mg/kg p.o.), and vegetable oil (10 ml/kg, p.o.). The significant reduction in writhes the number of treated groups was compared to that of the control and standard groups.

Formalin Test

The formalin test was carried out as previously described.^{6,13} Briefly, four groups of 6 rats, each one was treated orally with vegetable oil (10 ml/kg), Morphine (10 mg/kg), and EOSA (250-400 mg/kg). One hour after treatment, rats were injected with 50 µl of 2.5% formalin (in 0.9% saline) in the ventral surface of the right hind paw and the duration of paw licking was determined 0-5 min (first phase), and 20-25 min (second phase) after formalin injection. A nociceptive score was determined for each phase by measuring the amount of time spent biting/licking of the injected paw.

Hot Plate Test

The test was performed as previously described.⁶ Four groups of 6 mice each were treated with EOSA (250 and 400 mg/kg, p.o.), morphine (10 mg/kg p.o.), and vegetable oil (10 ml/kg, p.o.). Briefly, the time (seconds) for paw licking

or jumping was taken as reaction time and was measured in regular time intervals and the reaction strength of each rat was determined before and after drug treatment at 30 min, 60 min, and 120 min. The groups administered with tested extract were compared to control and standard drug groups.¹⁴

Statistical Analysis

The statistical treatment of the data was carried out on the XLSTAT Version 7.1 software and the IBM SPSS Statistics Version 20 software. All values were expressed as means ± standard deviation. The results obtained were statistically analyzed by a one-factor and two-factor ANOVA followed by a post hoc multiple comparison tests of the differences between the groups by applying the Tukey HSD test. Results were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

GC-MS Analysis

The composition of the EOSA was performed using the GC-MS method. Table 1 illustrated the more important data of the compounds (Calculated IR, identification of compounds, theoretical IR, and %GC-MS).

Table 1. GC-MS Data from the Essential Oil of *S. argel*

N°	IR ^a	Compounds	IR ^b	%GC-MS ^c	Identification
1	983	cis-2,6-Dimethyl-2,6-octadiene		0.126	RI, MS
2	1000	trans-2-(2-Pentenyl)furan	1007	0.326	RI, MS
3	1024	D-Limonene	1025	0.903	RI, MS
4	1035	Z-β-Ocimene	1038	0.552	RI, MS
5	1045	E-β-Ocimene	1048	0.949	RI, MS
6	1083	α-Terpinolen	1085	0.885	RI, MS
7	1106	Linalool	1103	57.103	RI, MS
8	1107	1,5,7-Octatrien-3-ol, 3,7-dimethyl-	1104	1.047	RI, MS
9	1173	Terpinene-4-ol	1174	0.245	RI, MS
10	1190	Terpineol	1189	12.954	RI, MS
11	1212	p-Menth-1-en-9-al	1232	0.430	RI, MS
12	1228	Nerol (cis-Geraniol)	1226	4.678	RI, MS
13	1257	trans-Geraniol	1258	12.658	RI, MS
14	1286	Eduan I, dihydro-	1289	0.679	RI, MS
15	1379	β-Damascenone	1382	0.487	RI, MS
16	1449	Geranyl acetone	1452	0.124	RI, MS
17	1480	β-Ionene	1483	0.184	RI, MS
18	1713	Pentadecanal	1713	0.441	RI, MS
19	1844	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	1843	0.21	RI, MS
20	1970	n-Hexadecanoic acid	1970	0.462	RI, MS
%Identification				95.443	

^aRetention indices with respect to C5-C28 n-alkanes calculated on non-polar HP5-MS capillary column; ^bRetention indices given in literature (NIST or Wiley on non-polar HP-MS or DB5-MS capillary column); ^cPercentage calculated from the peaks areas of GC chromatogram on non-polar HP5-MS capillary column.

The extraction of the essential oil from the leaves of *S. argel* by hydrodistillation yielded a very fragrant yellow oil. The yield obtained per 100 g of the plant is 0.3% (v/w). Twenty components were identified, representing 95.44% of the total EOSA components characterized.

NMR Analysis

The main component of EOSA revealed by GC-MS analysis was linalool. To confirm that, the essential oil was analysed

by NMR spectroscopy. The ¹H NMR clearly shows the three methyl groups and the vinylic protons at the expected chemical shifts (Figure 1).

In the vinylic system composed of carbons C-1 and C-2, it is obvious that the two protons linked to carbon C-1 are not equivalent and appear at δ 5.05 and 5.23 ppm with coupling constants typical of geminated protons ($J = \sim 1$ Hz) and a vicinal coupling constant typical of a *cis* ($J = \sim 11$ Hz) and *trans* ($J = \sim 15$ Hz) configuration. These last constants are a

result of the coupling with proton H-2, which appears as a double doublet at δ 5.91 ppm and allows the identification of the proton H-1_{cis} δ 5.05 ppm and H-1_{trans} 5.23 ppm (Figure 1).

These identifications could be confirmed by the two-dimensional NMR experiments. The other protons could also be detected by these experiments, which also allowed the confirmation of proton H-6 assignment and the methyl group identification. The ^{13}C NMR spectrum also confirms the linalool structure and using both the HSQC and HMBC spectra was possible to identify the most relevant signs, from which carbon C-3 at δ 74 ppm can be highlighted.

Acute Toxicity

The results of the EOSA acute toxicity study are shown in Tables 2 and 3. Oral administration of EOSA at doses of 500, 1000, and 2000 mg/kg did not cause any visible symptoms of toxicity in the treated rats. No neurological toxicity or behavioural changes were observed and a

progressive body weight gain was noted throughout the experimental period.

Furthermore, no significant differences were revealed regarding the levels of biochemical parameters of blood serum, except for AST ($p < 0.002$) and ALT ($p < 0.002$) values recorded at a dose of 2000 mg/kg compared to the control.

At the end of the test, control rats and those treated with EOSA at different doses were autopsied and their liver, kidneys, lungs, spleen, and heart were histopathological examined. The post-mortem examination revealed that the size, colour, and shape of the various organs removed in situ were normal, and no lesions of ischemic necrosis or a focus suspected of tissue damage were observed.

Histopathological examination from the control rats revealed no abnormality of the lesions. However, the hepatic lesions detected in rats treated with EOSA appeared at a dose of 2000 mg/kg and are described by light and focal venous stasis (Figure 2).

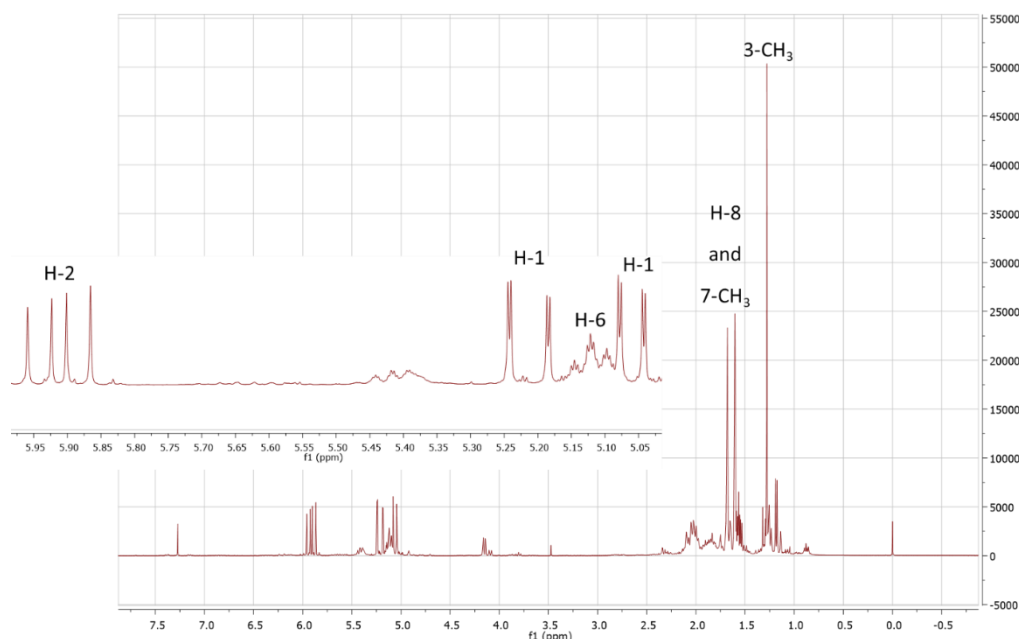


Figure 1. ^1H NMR Spectrum of *Solenostemma argel*/Essential Oil.

Table 2. Monitoring Body Weight (g) of Rats during the Toxicity Study

	Control	EOSA		
		500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
0 day	183 $\pm$ 1.224	177.6 $\pm$ 1.140	177.6 $\pm$ 0.547	178.4 $\pm$ 1.140
7th day	183.6 $\pm$ 4.393	185.6 $\pm$ 1.816	186.8 $\pm$ 1.303	186 $\pm$ 1.581
14th day	191.4 $\pm$ 2.880	186.8 $\pm$ 3.563	193.8 $\pm$ 3.563	192.8 $\pm$ 4.024

Table 3. Biochemical Parameters of Blood Serum during the Toxicity Study

	Control	EOSA		
		500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
Urea (g/L)	0.446 $\pm$ 0.07	0.448 $\pm$ 0.06	0.484 $\pm$ 0.07	0.461 $\pm$ 0.07
Creatinine (mg/L)	11.306 $\pm$ 0.38	9.15 $\pm$ 1.28	9.390 $\pm$ 0.84	8.260 $\pm$ 1.71
ALP (U/L)	133.94 $\pm$ 6.92	94.358 $\pm$ 19.25	99.82 $\pm$ 27.14	101.44 $\pm$ 16.95
ALT (U/L)	51.78 $\pm$ 4.74 ^a	68.694 $\pm$ 14.71	106.72 $\pm$ 45.98	128.38 $\pm$ 24.93 ^b
AST (U/L)	62.16 $\pm$ 6.44 ^a	84.4 $\pm$ 18.94	114.76 $\pm$ 24.09	146.34 $\pm$ 19.40 ^b
Total protein (g/L)	70.18 $\pm$ 1.30	62.052 $\pm$ 6.16	56.242 $\pm$ 7.48	60.632 $\pm$ 8.76
Albumin (g/L)	31.54 $\pm$ 1.71	40.224 $\pm$ 4.28	33.244 $\pm$ 2.78	34.914 $\pm$ 3.16

Values are expressed as mean $\pm$ Standard deviation (n = 5). The numbers with the same letter show no significant difference ($p > 0.05$).

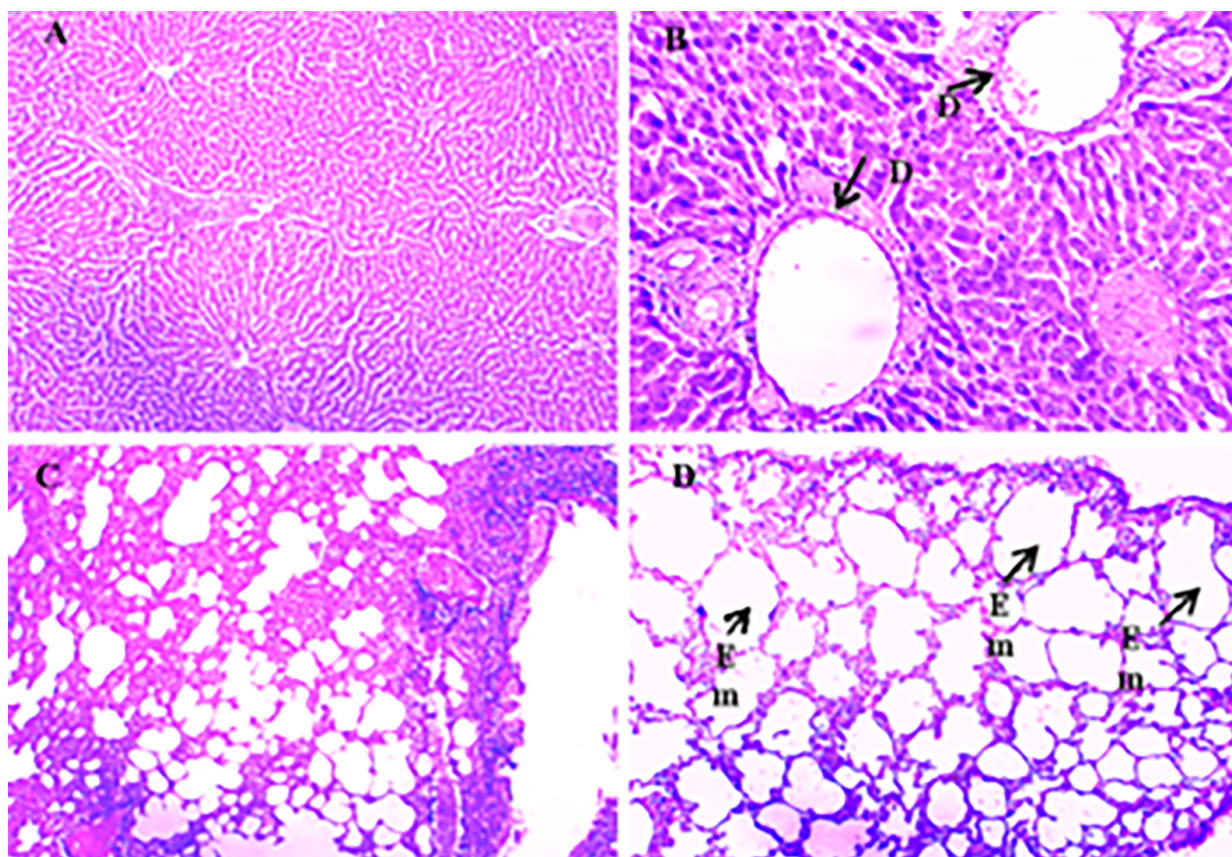


Figure 2. Histopathological Analysis of Liver and Lungs Treated with EOSA in the Acute Toxicity stained with Hematoxylin and Eosin Method (H&E). (A) Control: normal liver parenchyma x4; (B) EOSA 2000 mg/kg: focal venous stasis x10; (C) Control: normal lung parenchyma x10; (D) EOSA 1000 and 2000 mg/kg: peripheral emphysema x10. D: Dilatation, Em: Emphysema.

Furthermore, an anatomopathological examination of the lungs described discrete and slight pulmonary lesions in the form of oedematous alveolitis and peripheral emphysema observed at doses of 1000 and 2000 mg/kg (Figure 2). At the end, the anatomopathological examination of the kidneys, heart, and spleen unveiled the absence of toxic lesion for all the doses tested.

Analgesic Activity

Writhing Test in Mice

The effect of EOSA on peripheral pain is shown in Table 4. The oral administration of EOSA at doses of 250 and 400 mg/kg generated an important dose-dependent diminution in the number of writhing induced by intraperitoneal injection of acetic acid compared to the control group ($p < 0.0001$), with an inhibition rate of cramps of 72.71 and 92.41%, respectively. In addition, the reference drug resulted in a

significant analgesic effect similar to that of EOSA at a dose of 250 mg/kg.

Formalin Test

As illustrated in Figure 3, EOSA caused an important dose-dependent inhibition of both neurogenic and inflammatory phases of the formalin test at doses of 250 and 400 mg/kg compared to the control ($p < 0.0001$). In the early phase, the percentage of inhibition recorded was 55.6 and 77.8% respectively, while for the last phase, the rate reached 61.1 and 88.9% respectively, considering the control group.

In this pain model, the recorded anti-nociceptive effects are significantly greater against the second phase. As expected, the standard drug morphine (10 mg/kg) produced a strong anti-nociceptive activity in both phases with an inhibition percentage of 100 and 88.9% in the early and last phases in that order. The protective property recorded in the

Table 4. Effect EOSA on Writhing Test in Mice

	Dose (mg/kg bw.)	Number of Writhes	%Inhibition
Control	(10 mg/kg b w.)	57.83 ± 4.79 ^a	-
Indomethacin	10	12.16 ± 1.83 ^b	78.93 ^a
EOSA	250	15.66 ± 2.33 ^b	72.71 ^a
EOSA	400	4.33 ± 5.16 ^c	92.41 ^b
		***	***

Values are expressed as mean ± Standard deviation (n = 6). The numbers with the same letter show no significant difference after analysis of one-way ANOVA followed by Tukey test. *** $p < 0.0001$ compared to the control group.

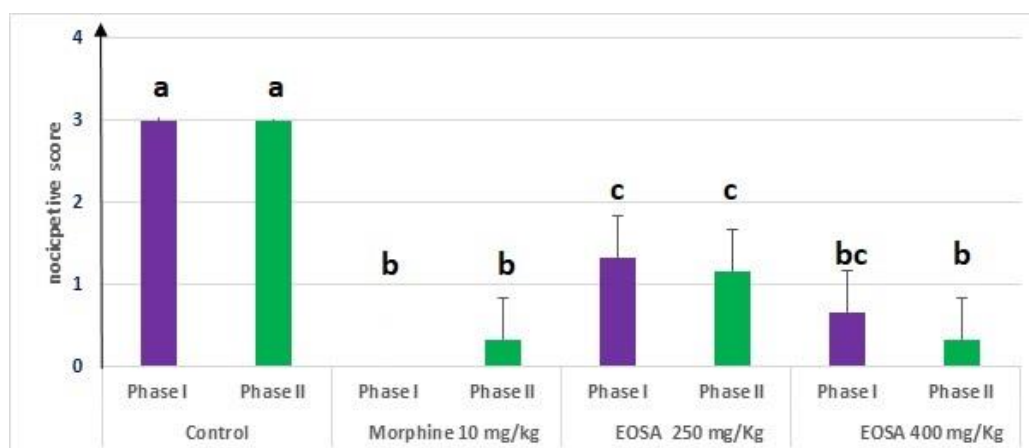


Figure 3. Effect of EOSA on Formalin Test in Rats. Nociceptive scores are expressed as mean $\pm$ Standard deviation ($n = 6$). The numbers with the same letter show no significant difference after analysis of one-way ANOVA followed by Tukey test.

Table 5. Effect of EOSA on Hot Plate Test in Mice

Dose (mg/kg b.w.)		Latency			
		T _{30 min}	T _{60 min}	T _{90 min}	T _{120 min}
Control	(10 mg/kg b.w.)	5.38 $\pm$ 0.08 ^a	5.45 $\pm$ 0.05 ^a	5.34 $\pm$ 0.08 ^a	5.33 $\pm$ 0.08 ^a
Morphine	10	30.19 $\pm$ 0.14 ^b	30.90 $\pm$ 0.04 ^b	30.09 $\pm$ 0.04 ^b	30.05 $\pm$ 0.04 ^b
EOSA	250	12.44 $\pm$ 0.82 ^c	15.56 $\pm$ 0.26 ^c	9.34 $\pm$ 0.44 ^c	8.29 $\pm$ 0.48 ^c
EOSA	400	30.02 $\pm$ 1.24 ^b	30.38 $\pm$ 0.34 ^b	20.82 $\pm$ 1.42 ^d	17.84 $\pm$ 0.94 ^d

Values are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 6$). The numbers with the same letter show no significant difference after analysis of one-way ANOVA followed by Tukey test. *** $p < 0.0001$ compared to the control group.

last phase by EOSA at the dose of 400 mg/kg was similar to morphine (Figure 3).

Hot Plate Test

The result of the analgesic property of EOSA on central pain induced by the hot plate is shown in Table 5. It indicated that oral administration of the EOSA at doses of 250 and 400 mg/kg considerably attenuated the hot-plate thermal stimulation all along the time points studied ($p < 0.0001$), considering the control group. The analgesic effect of EOSA at the dose of 400 mg/kg was comparable to the standard drug morphine (10 mg/kg) at measurement times of 30 and 60 min. In contrast, morphine substantially prolonged the hot-plate latency and produced a strong anti-nociceptive effect all through the time points studied compared to control and EOSA at doses of 250 and 400 mg/kg ($p < 0.0001$).

EOSA prolonged the latency to nociceptive behaviour in the hot plate test, with a maximum inhibition percentage of 82.04% recorded at 60 min at a dose of 400 mg/kg comparable to that of morphine (82.33%) at the same time, suggesting that it has a very significant central analgesic effect.

Discussion

The GC-MS analysis of the essential oil of *S. argel* leaves allowed the identification of twenty components. Considering the general guidelines¹⁴ indicating that a component is considered as major if it represents 20 to 70% of the

components present in the mixture, linalool only can be considered as a major component representing more than 57% of the essential oil components of *S. argel*. Nevertheless, other components such as terpineol (12.954%) and trans-geraniol (12.658%) represent more than 10% of the mixture and can participate in the recorded biological effects. NMR analysis of the essential oil of *S. argel* has shown that the main compound is linalool. Generally, this major component determines the pharmaceutical activities of the essential oil.¹⁵

During the experimental period of acute toxicity of EOSA, no sign of morbidity or mortality was observed during the experiment indicating good apparent tolerance of the essential oil of *S. argel* by rats. Increased levels of AST and ALT recorded in rats treated at dose of 2000 mg/kg may be a result of liver toxicity. Effectively, increases in ALT and AST levels in serum are related to liver toxicity from hepatotoxic drugs.¹⁶

The evaluation of pathological damage in the organs, both macro and microscopically, is the basis of safety testing.¹⁷ The results recorded after histological examination demonstrate the low oral toxicity of EOSA for the highest doses of 1000 and 2000 mg/kg.

The acetic acid writhing test is a sensitive test for both opioid and non-opioid analgesics, widely used for evaluating peripheral analgesics.¹⁸ EOSA significantly inhibited the number of writhing responses in mice in all concentrations evaluated showing a significant analgesic effect. The pain induced by the injection of acetic acid generates the release of substance P, serotonin, histamine, bradykinin, and

prostaglandins (PGE2 α , PGF2 α) stimulating the peripheral nociceptive neurons and increasing the vascular permeability.^{19,20} Therefore, EOSA probably acts by inhibition of one or more of these chemical mediators.

The formalin test is a pain model consisting of two different phases. The first phase (from 0 to 5 min after injection of formalin) results from direct stimulation of nociceptors. Substance P, glutamate, and bradykinin are described to participate in this phase, consisting of non-inflammatory pain. The second phase (from 15 to 30 min) is thought to be an inflammatory response with associated pain, a process in which several inflammatory mediators are involved, including histamine, serotonin, prostaglandins, and bradykinin.^{21,22}

EOSA induced analgesic activity on both phases of the formalin test, indicating that both have a direct effect on the nociceptor and inflammatory pain inhibition. Data obtained in the formalin test agree with those from the hot plate and writhing tests. This effect of EOSA is probably due to the inhibition of the synthesis or action of kinin and prostaglandins or both.

The standard hot-plate test is based on the thermal stimulus-induced hyperalgesia specific for centrally mediated nociception.²¹ The anti-nociceptive effect recorded confirms the activity on the central pain shown in the first phase of the formalin test and is probably mediated by inhibition of central pain receptors.

The anti-nociceptive effect of EOSA can be attributed to the action of its main compound, linalool, or to the synergistic action of other compounds. Several *in vivo* studies confirm the anti-nociceptive properties of linalool. Indeed, a previous study demonstrated the anti-nociceptive effect of linalool both on the inflammatory pain induced by acetic acid during the writhing test, and on neurogenic pain during the hotplate test.²³ They also demonstrated the anti-nociceptive effect of linalool on formalin-induced pain during formaldehyde testing phases.²⁴ The anti-nociceptive properties of linalool have been mainly attributed to a positive effect on the opioid, dopaminergic and muscarinic signal pathways as well as to the negative modulation of glutamatergic pathway.²⁵ In fact, the anti-nociceptive activity produced by linalool during the writhing test seems to depend both on cholinergic and opioidergic neuro-transmission, whereas, during the hot plate test, linalool appears to activate different mechanisms such as muscarinic transmission, via M2 receptors, opioidergic transmission and dopaminergic transmission, via D2 receptors as well as K⁺ channels.²⁶

Furthermore, terpineol present in EOSA may also participate in the anti-nociceptive effect recorded. Indeed, the previous studies reported the anti-nociceptive activity of terpineol on models of peripheral and central pain, suggesting anti-nociceptive effects associated with the

release inhibition of substance P and other inflammatory molecules such as serotonin, histamine, bradykinin, and prostaglandins.^{27,28} Terpineol can also inhibit the expression of pro-inflammatory cytokines and the activation of the NF- κ B pathway.²⁹ In addition, geraniol, another component of EOSA, could contribute to the observed anti-nociceptive effect. Indeed, a previous study demonstrated the anti-nociceptive action of geraniol by two experimental models, the writhing test, and the formaldehyde test. Geraniol elicited a significant anti-nociceptive effect in the second phase of the formalin test and in the writhing test, suggesting that its anti-nociceptive property is mainly related to the inhibition of the inflammation and the peripheral pain by the release of pro-inflammatory mediators including bradykinin, prostaglandins, and serotonin.³⁰

Conclusion

This study demonstrates for the first time the anti-nociceptive effects of *S. argel* essential oil on central and peripheral pain. Our data give scientific support to the use of *S. argel* in traditional medicine to cure pain. The safety and effectiveness of *S. argel* essential oil at the doses tested make it an interesting therapeutic agent against pain, alone or in combination with other analgesics. Our future study will be based on the possible mechanisms of action of this oil during the analgesic process.

Authors' Contributions

DKB was the main investigator participating at all parts of the work. BC participated to the writing and the reviewing of the manuscript. HA and SB participated to the chemical characterization of the EOSO. DCGAP supervised the chemical study. HB and KB were involved in the histopathologic studies. SZ performed the statistics. MHB was the supervisor of the work. All authors have read and approved the final manuscript.

Funding

No specific funding for this work which is part of the global work of the Animal Health and Production Research Laboratory of the Higher National Veterinary School of Algiers.

Conflict of Interest Disclosures

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgment

We thank the University of Aveiro and the FCT/MCT for the financial support for the LAQV-REQUIMTE (UIDB/50006/2020 and UIDP/50006/2020) through national funds and, where applicable, co-financed by the FEDER, within the PT2020 Partnership Agreement. The authors thank Dr Kris Vernelen (Sciensano) for his critical reading of this manuscript.

References

- Batista PA, de Paula Werner MF, Oliveira EC, Burgos L, Pereira P, da Silva Brum LF, et al. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. *J Pain*. 2010;11(11):1222-9. doi:10.1016/j.jpain.2010.02.022
- Al-Sobarry M, Alwashli A, Cherrah Y, Alaoui K. Toxicité aiguë et action analgésique d'extrait éthanolique des feuilles d'Aloe perryi, plante endémique du Yémen. *Phytothérapie*. 2013;11(1):17-21. doi:10.1007/s10298-013-0752-8
- Bounihi A, Hajjaj G, Alnamer R, Cherrah Y, Zellou A. *In vivo* potential anti-inflammatory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil. *Adv Pharmacol Sci*. 2013;2013:101759. doi:10.1155/2013/101759
- Benhouhou S. *Solenostemma argel* (Del.) Hayne. In: A guide to medicinal plants in North Africa. Centre for Mediterranean Cooperation, International IU CN. 2005.
- Gurib-Fakim A, Schmelzer GH. Ressources végétales de l'Afrique tropicale : Plantes médicinales 2. Fondation PROTA/CTA, Wageningen, Pays Bas. 2013.
- Benmaarouf DK, Pinto DC, China BE, Zenia SA, Bendesari KB, Ben-Mahdi MH. Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive effects of acetone extract of Algerian *Solenostemma argel* (Delile) Hayne leaves. *Int J Curr Pharm Res*. 2020;12:72-81. doi:10.22159/ijcpr.2020v12i5.39771
- Innocenti G, Dall'Acqua S, Sosa S, Altinier G, Della Loggia R. Topical anti-inflammatory activity of *Solenostemma argel* leaves. *J Ethnopharmacol*. 2005;102(2):307-10. doi:10.1016/j.jep.2005.06.007
- Jabeen F, Tharib SM, Veitch GB. An investigation of the anti-inflammatory activity of *Solenostemma argel*. *Fitoterapia*. 1984;55:186-9.
- Mudawi ME, Chidrawar VR, Yassine YA, Habeballa RS, El-Wahab ME, Soulaïman MI. Antalgic activity of *Solenostemma argel* by modulating pain nociception pathway in mice. *World J Pharma Res*. 2015; 4(4):187-197
- Du Sert NP, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol*. 2020;18(7):e3000411. doi:10.1371/journal.pbio.3000411
- OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects- Test No. 420: Acute oral toxicity- Fixed dose procedure, 2002. doi:10.1787/9789264070943-en
- Koster R, Anderson M, De Beer E. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc*. 1959;18:412.
- Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987;30(1):103-14. doi:10.1016/0304-3959(87)90088-1
- Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S, Mahmood ZA. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. *Asian Pac J Trop Med*. 2014;7:S461-8. doi:10.1016/S1995-7645(14)60275-3
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(2):446-75. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Ramaiah SK. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clin Lab Med*. 2011;31(1):161-72. doi:10.1016/j.cll.2010.10.004
- Prabu PC, Panchapakesan S, Raj CD. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* roots in Wistar rats. *Phytother Res*. 2013;27(8):1169-78. doi:10.1002/ptr.4854
- Alvarenga FQ, Mota BC, Leite MN, Fonseca JM, Oliveira DA, de Andrade Royo V, et al. *In vivo* analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. *J Ethnopharmacol*. 2013;150(1):280-4. doi:10.1016/j.jep.2013.08.044
- Vanderlinde FA, Landim HF, Costa EA, Galdino PM, Maciel MA, Anjos GC, Malvar DD, Cõrtes WD, Rocha FF. Evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the acetone extract from *Anacardium occidentale* L. *Braz J Pharm Sci*. 2009;45:437-42. doi:10.1590/S1984-82502009000300008
- Gorzalczany S, Marrassini C, Mico J, Acevedo C, Ferraro G. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*. *J Ethnopharmacol*. 2011;134(3):733-8. doi:10.1016/j.jep.2011.01.025
- Zhao J, Fang F, Yu L, Wang G, Yang L. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton crassifolius* ethanolic extract. *J Ethnopharmacol*. 2012;142(2):367-73. doi:10.1016/j.jep.2012.04.050
- Xu Q, Wang Y, Guo S, Shen Z, Wang Y, Yang L. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. *J Ethnopharmacol*. 2014;152(3):540-5. doi:10.1016/j.jep.2014.01.037
- Peana AT, Paolo SD, Chessa ML, Moretti MD, Serra G, Pippia P. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. *Eur J Pharmacol*. 2003;460(1):37-41. doi:10.1016/S0014-2999(02)02856-X
- Peana AT, De Montis MG, Nieddu E, Spano MT, Paolo SD, Pippia P. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. *Eur J Pharmacol*. 2004;485(1-3):165-74. doi:10.1016/j.ejphar.2003.11.066
- Aprotosoaie AC, Hâncianu M, Costache II, Miron A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. *Flavour Fragr J*. 2014;29(4):193-219. doi:10.1002/ffj.3197
- Peana AT, Moretti MD. Linalool in essential plant oils: pharmacological effects. *Botanical medicine in clinical practice*. Wallingford UK: CAB International. 2008. pp. 716-24. doi:10.1079/9781845934132.0716
- Quintans-Júnior LJ, Oliveira MG, Santana MF, Santana MT, Guimarães AG, Siqueira JS, et al. α -Terpineol reduces nociceptive behavior in mice. *Pharm Biol*. 2011;49(6):583-6. doi:10.3109/13880209.2010.529616
- de Oliveira MG, Marques RB, de Santana MF, Santos AB, Brito FA, Barreto EO, et al. α -Terpineol reduces mechanical hypernociception and inflammatory response. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;111(2):120-5. doi:10.1111/j.1742-7843.2012.00875.x
- Khaleel C, Tabanca N, Buchbauer G. α -Terpineol, a natural monoterpene: A review of its biological properties. *Open Chem*. 2018;16(1):349-61. doi:10.1515/chem-2018-0040
- La Rocca V, da Fonscka DV, Silva-Alves KS, Ferreira-da-Silva FW, de Sousa DP, Santos PL, et al. Geraniol induces antinociceptive effect in mice evaluated in behavioural and electrophysiological models. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2017;120(1):22-9. doi:10.1111/bcpt.12630



Effectiveness of *Solenostemma Argel* Extract on *Dermanyssus Gallinae* in Budgies (*Melopsittacus undulatus*)

Daouia K. Benmaarouf^{1*} , Amina Laieb² , Bernard China³ , Nezha Khouchane² , and Meriem H. Ben-Mahdi¹

¹Unit for evaluating the efficacy of pharmacological molecules and developing alternative strategies, Animal Health and Production Research Laboratory, Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire, Algiers, Algeria

²Department of Veterinary Zoology, Jardin d'essai El Hamma, Algiers, Algeria

³Sciensano, Belgian institute of Health, Wytsmanstreet 14, 1050 Brussels, Belgium

*Corresponding author's Email: d.benmaarouf@gmail.com

CASE SERIES
 pii: S2322-45682300028-13
 Received: 20 March 2023
 Accepted: 07 May 2023

ABSTRACT

Dermanyssus gallinae (*D. gallinae*) is an important ectoparasite in veterinary and human medicine due to its role as a vector of infectious disease-causing pathogens and its economic impact. The present study reported the infestation of 45 budgies (*Melopsittacus undulatus*) reared in an aviary at the Jardin d'essai Zoo, Algiers, Algeria, showing signs of pruritus with sores due to itching. Skin samples were taken from the 45 budgies (26 females, 19 males), 26 nests, and an aviary containing the budgies were microscopically analyzed. The findings indicated the presence of *D. gallinae* (hematophagous mite) in all budgies and nests. To fight against this red mite, a treatment based on the *Solenostemma argel* (*S. argel*) aqueous extract was implemented. The *S. argel* aqueous extract 2% showed a fast and effective influence on *D. gallinae* mites present in the budgies, nests, and aviary. The aqueous extract of *S. argel* leaves could be a good candidate in the fight against red mites.

Keywords: Aqueous extract, Budgie, *Dermanyssus gallinae*, *Solenostemma Argel*

INTRODUCTION

Dermanyssus gallinae (*D. gallinae*), also called false louse or red louse of poultry, is a hematophagous avian parasitic mite with nocturnal activity. Its reservoir is usually the nests of various birds, aviaries, and chicken coops (Magdoud et al., 2019). The *D. gallinae* can infest other hosts, particularly dogs, cats, rabbits, horses, and humans (Dogramaci et al., 2010). The *D. gallinae* mite infestation is a serious public health concern, as the prevalence of red mites is expected to increase due to recent changes in hen-rearing practices, increased resistance to acaricides, global warming, and the lack of a sustainable approach to control infestations by this parasite (Sigognault Flochlay et al., 2017). The *D. gallinae* can cause great economic losses justifying the development of new effective and safe treatments for animals (Sadr et al., 2022). The increase in the rate of resistance to acaricides used against this parasite limits the effectiveness of these products (Decru et al., 2020). Several research studies have been carried out to establish alternative herbal treatments for the treatment and prophylaxis of *D. gallinae* infestation (Ghavami et al., 2020; Amer et al., 2021; Sadr et al., 2022). This clinical case falls within this context.

Solenostemma argel (*S. argel*) is a tropical plant widely used in traditional medicine for the treatment of several ailments, including gastrointestinal disorders, diabetes, rheumatism, lung, liver, and kidney infections, pain, inflammation, and wounds (Innocenti et al., 2005). The *S. argel* is distributed in the desert regions of Algeria, Egypt, Libya, and Sudan (Benmaarouf et al., 2020). The aerial parts of *S. argel* were formerly used in animal husbandry to control parasites present in animal drinking water (Benmaarouf et al., 2020). The *S. argel* extracts are known to have antibiotic, antifungal (Farrah and Ahmed, 2016), and insecticidal properties (Gipreel et al., 2020). The aim of this case study was to make known the effectiveness of the aqueous extract of *S. argel* on mite *D. gallinae* eradication.

CASE REPORT

The case of the current study was a budgie aviary located in the Jardin d'essai Zoo in Algiers, Algeria. The aviary housed 45 budgies (*Melopsittacus undulatus*), consisting of 26 females and 19 males, aged between 1 to 4 years (Figure 1). The zoo care staff reported signs of pruritus with squama and sores due to feather pecking, stress, and restlessness in the birds. Furthermore, the sanitary condition of the aviary was reported to be unsanitary, with bird feces present on the floor and in the drinking water (Pavlicevic et al., 2019; Decru et al., 2020). The sanitary condition of the aviary was not safe for birds. More precisely, the aviary, floor, and drinking water were soiled with bird feces.

The study was performed on October 2022 under a high relative temperature of 35°C and humidity of 70%. The clinical examination by a veterinarian highlighted the presence of pruritus signs as well as scales on the whole of the budgies' skin and in a greater quantity under their wings. Regarding the general clinical signs, the veterinarians observed a lack of appetite and restlessness in all individuals.



Figure 1. Budgerigar aviary in the Jardin d'essai zoo of Algiers, Algeria

Complementary examinations

To collect dander, skin samples were taken from the budgies in the form of scrapings, with at least one sample per animal. Feathers were also taken. In addition, samples were taken from the soil of the aviary and 26 nests. All the samples were then stained with lactophenol cotton blue (Sigma-Aldrich, Merck, Germany) and observed under an optical microscope (10x, Motic BA310, MoticEurope, Germany). Direct examination of collected specimens at the veterinary school of Algiers, Algeria, revealed the presence of blood-engorged *D. gallinae* mite (Figure 2 A), characterized by styliform chelicerae, long legs, and a dorsal shield narrowing at the rear (Sparagano and Giangaspero, 2011). Direct microscopic examination also indicated *Malassezia spp.* yeasts in very large numbers per field (Figure 2 B). The presence of *Malassezia* yeasts was a sign of a fungal superinfection, probably due to the weakening of the immune defenses (Velegaki, 2015; Hobi et al., 2022).

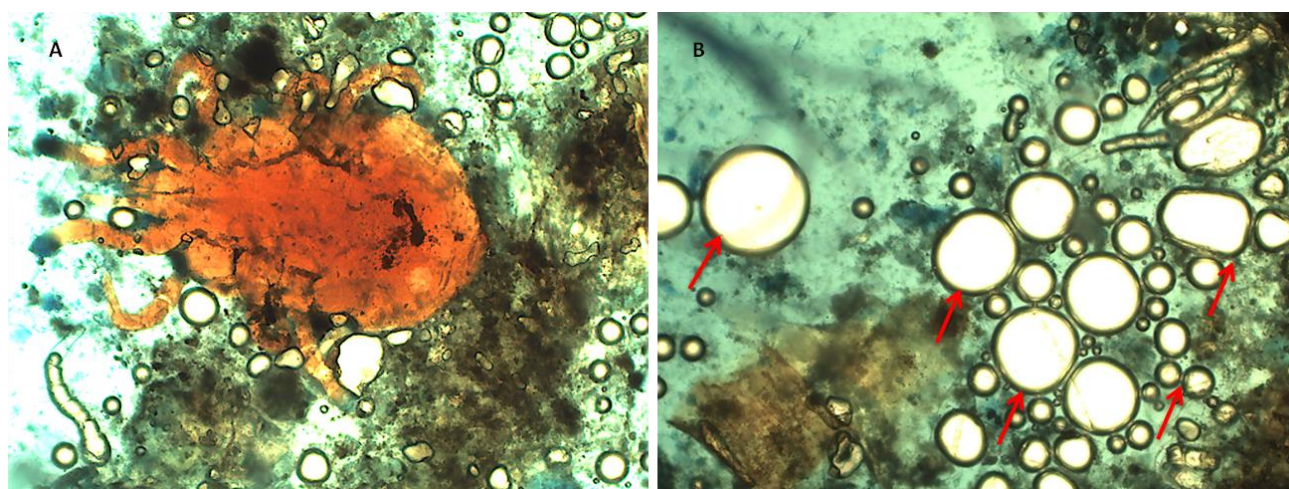


Figure 2. *Dermanyssus gallinae* (A) and *Malassezia spp.* (white spherical structures arrowed, B) collected from *Melopsittacus undulatus* (Algiers, Algeria, October 2022), magnification 10x.

Preparation of the extract

The aqueous extract was prepared from the leaves of the *S. argel* plant harvested in southern Algeria in the region of Abalessa in Tamenrasset in February 2022. The identification of the plant was carried out by the botanical service of the National School of Agronomy (Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, ENSA) of Algiers in Algeria with the delivery of an identification certificate (ENSA 08/01/2020). Reference specimens have been deposited in the herbarium

of the Animal Health and Production Laboratory of the National Veterinary School of Algiers (Santé Production Animale, SPA. 031).

The lyophilized aqueous extract was prepared by mixing 20 g of powdered dried leaves of *S. argel* in 1000 ml of boiling water, and the mixture was boiled in a water bath for 30 min. The mixture was filtered and then adjusted to 1000 ml before being lyophilized (Abubakar and Haque, 2020). To make the 2% aqueous solution, 20 g of the powder was dissolved into 1 liter of sterile distilled water (Unpublished data).

Treatment

In order to eliminate the blood-sucking mite *D. gallinae*, the budgies were individually sprayed on the whole body and especially below the wings using a sprayer with a 2% aqueous solution based on *S. argel* for a week. The aviary and the nests were disinfected with the 2% aqueous extract of *S. argel*. Each day after the treatment, the budgies were individually examined by a veterinarian for the presence of squama and itching. A marked improvement was noticed from the first application. On day 7, one skin sample (scratching) per animal below the left wing was taken from the budgies and from the aviary and nests to verify the effectiveness of the treatment. Direct examination of the skin samples under an optical microscope (10x, Motic BA310, MoticEurope, Germany) revealed the absence of *D. gallinae* on all of the examined samples from the budgies (*Melopsittacus undulatus*, Figure 3 A, B, C) and in the aviary and the nests (Figure 3 D). In addition, interestingly, the commensal *Malassezia* yeasts were found in smaller numbers on budgie samples (Figure 3 C).

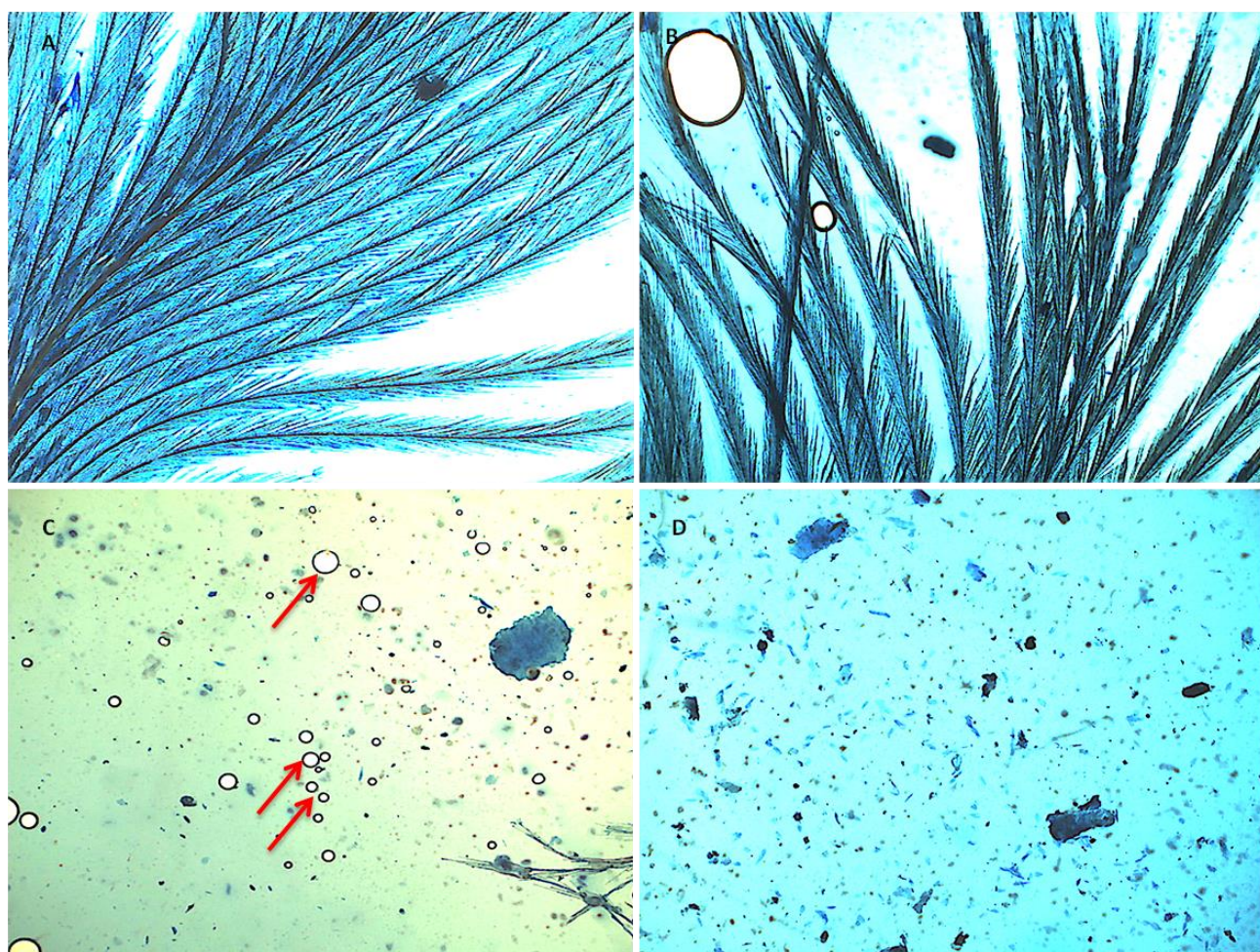


Figure 3. The treatment effects of aqueous extract of *S. argel* on *Dermanyssus gallinae* in samples with different sources in a zoo of Algiers (Algeria). **A, B, C:** Skin samples from budgies $\times 4$, **D:** Samples from aviary and nests $\times 4$. Red arrow: *Malassezia* spp. (spherical structures).

DISCUSSION

The *D. gallinae* is a cosmopolitan species, the most common Dermanyssidae mite, which parasites a wide range of hosts (Mullen and Oconnor, 2019). This mite is a major threat to the poultry industry and the breeding of ornamental birds worldwide, causing economic losses and serious animal health problems (Decru et al., 2020). The *D. gallinae* is a parasite of major importance both in veterinary and in human medicines insofar as it plays a vector role for several

pathogens, in particular, the bacteria *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Coxiella burnetii*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Borrelia burgdorferi*, and *Salmonella enteritidis* as well as Avian Influenza virus A, Newcastle virus and equine encephalomyelitis virus (Valiente et al., 2007; Sparagano and Giangaspero, 2011; George et al., 2015; Sommer et al., 2016; Sigognault Flochlay et al., 2017).

The increasing prevalence of *D. gallinae* mite infestation around the world is a matter for concern, and can be attributed to several factors. These include the transformation of housing systems into avian breeding facilities, non-compliance with proper aviary management practices, global warming, and a lack of effective methods for controlling infestations, as well as the increasing resistance of mites to commonly used acaricides such as carbamates and pyrethroids (Sparagano and Giangaspero, 2011; Sigognault Flochlay et al., 2017). Furthermore, a shortage of effective acaricides has been reported, as several chemical treatments have been withdrawn from the market due to their adverse effects on humans, which limits the available options for controlling mite infestations (Abbas et al., 2014; Sigognault Flochlay et al., 2017).

In Europe, very few products are licensed for use against *D. gallinae*, and except for a recently approved phoxim-based product, they can be used only when the poultry house is empty, that is, between two productive cycles (Sparagano and Giangaspero, 2011).

The present clinical case demonstrated the efficacy of *S. argel* aqueous extract on budgies *M. undulatus* infested with the mite *D. gallinae*. The extract also allowed the elimination of the red mite from the nests and the aviary. Several studies have highlighted the phytochemical composition of *S. argel* (Tigani and Ahmed, 2009; Shafek and Michael, 2012; Benmaarouf et al., 2020). In particular, the main constituents of the *S. argel* leaves extracts are flavonoids (rutin, quercetin, kaempferol, Cen-Pacheco et al., 2020), alkaloids (Wu et al., 2021), tannins (Fernández-Salas et al., 2011) and saponins (Pavela, 2016; Teia, 2018) known to have antibiotic and acaricide effects. Therefore, *S. argel* extracts represent an interesting candidate in the fight against the hematophagous mite *D. gallinae*. The insecticidal effect of *S. argel* extracts was previously described on *Tribolium castaneum* (Gipreel et al., 2020) or *Culex pipiens* (Al-Mekhlafi et al., 2018). Several recent studies have highlighted the acaricidal effects of plant-based products against *D. gallinae*. The studies carried out previously showed the effectiveness of 50 plant essential oils (such as garlic, thymus, or tea tree) on red mites with mortality rates ranging from 80 to 100% (George et al., 2009; George et al., 2010). Another study demonstrated significant acaricidal activity of the essential oils of cade, clove, mustard, laurel, coriander, pennyroyal, red and white thyme, cinnamon, and spearmint against *D. gallinae* using direct contact and fumigation methods (Kim et al., 2004).

However, favorable sanitary conditions are necessary to guarantee the effectiveness of different drugs and extracts in control of the red mite. the aqueous extract of *S. argel* leaves seems to have an effect on the reduction of *Malassezia* yeasts, indicating an antifungal effect. It is in agreement with a previous study showing an antifungal effect on *Candida albicans* (Farah and Ahmed, 2016).

CONCLUSION

The aqueous extract of *S. argel* allowed total eradication of the blood-sucking mite and zoonotic agent *D. gallinae* in the current study. The aqueous solution of *S. argel*, therefore, could be an effective and safe means of combating this ectoparasite. Moreover, the antifungal effect of *S. argel* extract is also suggested. The effect of *S. argel* extract on different ectoparasites, as well as the determination of the active substances, can be considered in future studies.

DECLARATION

Acknowledgments

The authors thank the staff of Jardin d'essai El Hamma Zoo, Algiers, Algeria.

Funding

No specific funding

Availability of data and materials

The raw data are available on demand from the corresponding author.

Authors' contributions

Daouia Keltoum Benmaarouf (DKB) is the major investigator, Amina Laieb is the zoo veterinarian collaborating with DKB for the diagnosis and the treatment of the animals, Bernard China was active in the redaction and verification of the manuscript, Nezha Khouchane is the director of the Zoo allowing the study, Meriem Ben Mahdi is the research supervisor. All authors confirmed the final draft of the article for submission to the journal.

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Ethical consideration

The authors take steps to abide by all ethical standards related to plagiarism, publication approval, inaccuracies in data, multiple submissions, and double publication.

REFERENCES

- Abbas RZ, Colwell DD, Iqbal Z, and Khan A (2014). Acaricidal drug resistance in poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) and approaches to its management. *World's Poultry Science Journal*, 70(1): 113-124. DOI: <https://www.doi.org/10.1017/S0043933914000105>
- Abubakar AR and Haque M (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1): 1-10. DOI: https://www.doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Al-Mekhlafi FA, Abutaha N, Farooq M, and Al-Wadaan M (2018). Insecticidal effect of *Solenostemma argel* extracts against *Culex pipiens*. *Journal of American Mosquito Control Association*, 34(3): 217-223. DOI: <https://www.doi.org/10.2987/17-6725.1>
- Amer AMM, Amer MM, Mekky HM, and Fedawy HS (2021). Effect of combined plant essential oils on *Dermanyssus gallinae*: *In vitro* and *in vivo* study. *World's Veterinary Journal*, 10(2): 199-206. DOI: <https://www.doi.org/10.36380/scil.2020.wvj26>
- Benmaarouf DK, Pinto DCGA, China B, Zenia S, Bouzid Bendesari K, and Ben-Mahdi MH (2020). Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive effects of acetone extract of algerian *solenostemma argel* (delile) hayne leaves. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 12(5): 72-81. DOI: <https://www.doi.org/10.22159/ijcpr.2020v12i5.39771>
- Cen-Pacheco F, Ortiz-Celiseo A, Peniche-Cardeña A, Bravo-Ruiz O, López-Fentanes FC, Valerio-Alfaro G, and Fernández JJ (2020). Studies on the bioactive flavonoids isolated from *Azadirachta indica*. *Natural Product Research*, 34(24): 3483-3491. DOI: <https://www.doi.org/10.1080/14786419.2019.1579808>
- Decru E, Mul M, Nisbet AJ, Vargas Navarro AH, Chiron G, Walton J, Norton T, Roy L, and Sleenckx N (2020). Possibilities for IPM strategies in european laying hen farms for improved control of the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): Details and state of affairs. *Frontiers in Veterinary Science*, 7: 565866. DOI: <https://www.doi.org/10.3389/fvets.2020.565866>
- Dogramaci AC, Culha G, and Elik SO (2010). *Dermanyssus gallinae* infestation: An unusual cause of scalp pruritus treated with permethrin shampoo. *Journal of Dermatological Treatment*, 21(5): 319-321. DOI: <https://www.doi.org/10.3109/09546630903287437>
- Farah AA and Ahmed EH (2016). Beneficial antibacterial, antifungal and anti-insecticidal effects of ethanolic extract of *Solenostemma argel* leaves. *Mediterranean Journal of Biosciences*, 1(4): 184-191. Available at: <http://medjchem-v3.azurewebsites.net/index.php/medjbio/article/view/605>
- Fernández-Salas A, Alonso-Díaz MA, Acosta-Rodríguez R, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, and Rodríguez-Vivas RI (2011). *In vitro* acaricidal effect of tannin-rich plants against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 175(1-2): 113-118. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.016>
- George DR, Masic D, Sparagano OAE, and Guy JH (2009). Variation in chemical composition and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* (De Geer) of four different Eucalyptus essential oils. *Experimental and Applied Acarology*, 48: 43-50. DOI: <https://www.doi.org/10.1007/s10493-008-9225-z>
- George DR, Sparagano OAE, Port G, Okello E, Shiel RS, and Guy JH (2010). Environmental interactions with the toxicity of plant essential oils to the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(1): 1-8. DOI: <https://www.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00855.x>
- George DR, Finn RD, Graham KM, Mul M, Maurer V, Valiente Moro C, and Sparagano OA (2015). Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary medical science. *Parasites & Vectors*, 8: 178. DOI: <https://www.doi.org/10.1186/s13071-015-0768-7>
- Ghavami S, Asasi K, and Razavi M (2020). Effect of polar and non polar extract of ferula assafoetida *Dermanyssus gallinae* *in vivo* and *in vitro* Conditions. *The Journal of World's Poultry Research*, 10(3): 429-435. DOI: <https://www.doi.org/10.36380/jwpr.2020.49>
- Gipreel NT, Abdelaziz MEM, Saeed AEM, and Ashwag MA (2020). Chemical composition, phytochemical screening and anti-insecticidal activity of aqueous and ethanolic of *Solenostemma argel* extracts. *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences*, 8(6): 213-217. Available at: <https://repository.sustech.edu/bitstream/handle/123456789/26146/APPENDIX2.pdf?sequence=3>
- Hobi S, Cafarchia C, Romano V, and Barrs VR (2022). *Malassezia*: Zoonotic implications, parallels and differences in colonization and disease in humans and animals. *Journal of Fungi*, 8(7): 708. DOI: <https://www.doi.org/10.3390/jof8070708>
- Innocenti G, Dall'Acqua S, Sosa S, Altinier G, and Della Loggia R (2005). Topical anti-inflammatory activity of *Solenostemma argel* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2): 307-310. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.007>
- Kim SI, Yi JH, Tak JH, and Ahn YJ (2004). Acaricidal activity of plant essential oils against *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Veterinary Parasitology*, 120(4): 297-304. DOI: <http://www.doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.016>
- Magdoud O, Chabchoub I, Gara S, Toumi A, and Mokni M (2019). Apport de la dermoscopie dans une ectoparasitose rare: *Dermanyssus gallinae* [Contribution of dermoscopy in a rare ectoparasitosis: *Dermanyssus gallinae*]. *Annales de dermatologie et de Vénééréologie*, 146(12S): A268. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.annder.2019.09.430>
- Mullen GR and Oconnor M (2019). Mites (Acari). *Medical and veterinary entomology*. Chapter 26, pp. 533-602. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/B978-0-12-814143-7-00026-1>
- Pavela R (2016). Acaricidal properties of extracts of some medicinal and culinary plants against *Tetranychus urticae* koch. *Plant Protection Science*, 52(1): 54-63. Available at: https://pps.agriculturejournals.cz/artkey/pps-201601-0007_acaricidal-properties-of-extracts-of-some-medicinal-and-culinary-plants-against-tetranychus-urticae-koch.php

- Pavlicevic A, Pavlovic I, Ratajac R, Popovic D, Davidovic B, and Krnjajic D (2019). Poultry welfare in terms of poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) impact and control. *Biotechnology In Animal Husbandry Journal*, 35(2): 1-11. DOI: <http://www.doi.org/10.2298/BAH1901001P>
- Sadr S, Ahmadi Simab P, Kasaei M, Gholipour Landi M, Borji H, and Adhami G (2022). Potential of anthelmintic herbal drugs against gastrointestinal nematodes in farm animals: A review. *Farm Animal Health and Nutrition*, 1(1): 26-30. Available at: https://fahn.rovedar.com/article_160944_3e6c82b5703b82558f72d30827da6569.pdf
- Shafek RE and Michael HN (2012). Antibacterial and antioxidant activity of two new kaempferol glycosides isolated from *Solenostemma argel* stem extract. *Asian Journal of Plant Sciences*, 11(3): 143-147. DOI: <https://www.doi.org/10.3923/ajps.2012.143.147>
- Sigognault Flochlay A, Thomas E, and Sparagano O (2017). Poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestation: A broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. *Parasites & Vectors*, 10: 4-9. DOI: <https://www.doi.org/10.1186/s13071-017-2292-4>
- Sommer D, Heffels-Redmann U, Köhler K, Lierz M, and Kaleta EF (2016). Role of the fowl poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) in the transmission of avian influenza a virus. *Tierärztliche Praxis Grosstiere*, 44(01): 26-33. DOI: <https://www.doi.org/10.15653/TPG-150413>
- Sparagano OAE and Giangaspero A (2011). Parasitism in egg production systems: The role of the red mite (*Dermanyssus gallinae*). *Egg chemistry, production and consumption*. pp. 394-414. DOI: <https://www.doi.org/10.1533/9780857093912.3.394>
- Teia FKF (2018). A review of *Solenostemma argel*: Phytochemical, pharmacological activities and agricultural applications. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 4(2): 98-101. DOI: <https://www.doi.org/10.31254/jahm.2018.4211>
- Tigani S and Ahmed S (2009). *Solenostemma argel* tissue culture for production of secondary metabolites. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 7(1): 19-23.
- Valiente MC, Chauve C, and Zenner L (2007). Experimental infection of *Salmonella enteritidis* by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology*, 146(3-4): 329-336. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.024>
- Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, and Boekhout T (2015). *Malassezia* infections in humans and animals: Pathophysiology, detection, and treatment. *PLoS Pathogens*, 11(1): e1004523. DOI: <https://www.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004523>
- Wu Y, Ren D, Gao C, Li J, Du B, Wang Z, and Qian S (2021). Recent advances for alkaloids as botanical pesticides for use in organic agriculture. *International Journal of Pest Management*, pp. 1-11. DOI: <https://www.doi.org/10.1080/09670874.2021.1917723>

Original Article

CHEMICAL ANALYSIS, ANTIOXIDANT, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF ACETONE EXTRACT OF ALGERIAN *SOLENOSTEMMA ARGEL* (DELILE) HAYNE LEAVES

DAOUIA KELTOUM BENMAAROUF^{a*}, DIANA C. G. A. PINTO^b, BERNARD CHINA^c, SAFIA ZENIA^a, KHEIRA BOUZID BENDESARI^d, MERIEM HIND BEN-MAHDI^a

^aUnit for Evaluating the Efficacy of Pharmacological Molecules and Developing Alternative Strategies, Sante and Productions Animales Research Laboratory, Ecole Nationale Supérieure Veterinaire, Algiers, Algeria, ^bDepartment of Chemistry and QOPNA, University of Aveiro, Campus de Santiago, 3810193 Aveiro, Portugal, ^cSciensano, the Belgian Health Institute, Quality of Laboratories, 1050 Brussels, Belgium, ^dDepartment of Pathology, Beni Messous Hospital, Algiers, Algeria
Email: d.benmaarouf@gmail.com

Received: 13 Jun 2020, Revised and Accepted: 16 Aug 2020

ABSTRACT

Objective: To investigate the qualitative composition of the acetonic extract from leaves of *S. argel* (AESA) and their anti-inflammatory and analgesic properties *in vivo*.

Methods: AESA profile was established by UHPLC/DAD/ESI-MS². AESA was subjected to the acute oral toxicity study according to the OECD-420 method. Antioxydant activity of AESA was performed by DPPH radical scavenging assay. Anti-inflammatory effects of AESA were determined in two animal models: carrageenan-induced paw edema in rats and cotton pellet-induced granuloma formation in rats. Further, anti-nociceptives activities of AESA were assessed by hot plate test, acetic acid-induced abdominal writhing test and formalin test.

Results: The *in vivo* AESA toxicity was low. AESA expresses a maximum radical scavenging activity with a IC₅₀ value of 36,05 µg/ml. The AESA at 250 and 400 mg/kg significantly reduced carrageenan induced paw edema by 70.09% and 85.53% 6h after carrageenan injection, respectively. AESA produced significant dose-dependent anti-inflammatory effect against cotton pellets-induced granuloma formation in rats. In addition, AESA at 250 and 400 mg/kg significantly reduced acetic acid-induced writhing by 56.83 and 80.41%, respectively. Oral administration of 250 and 400 mg/kg of AESA caused a significant dose dependent anti-nociceptive effect in both neurogenic and inflammatory phases of formalin-induced licking. AESA also impacted the pain latency in the hot plat test.

Conclusion: These data suggest that AESA possesses antioxidant, anti-inflammatory and anti-nociceptive effects. These results support the traditional use of *S. argel* to cure pain and inflammatory diseases in the Algerian Sahara.

Keywords: *Solenostemma argel*, UHPLC/DAD/ESI-MS², Antioxidant, Anti-inflammatory, Analgesic, Toxicity

© 2020 The Authors. Published by Innovare Academic Sciences Pvt Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)
DOI: <http://dx.doi.org/10.22159/ijcpr.2020v12i5.39771>. Journal homepage: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijcpr>

INTRODUCTION

A modern approach is to exploit the heritage of knowledge in traditional medicine by using advanced technologies for the identification, separation and application of biologically active molecules to specific pathologies. Recently, pathologies leading to pain and inflammation encountered a great attention for new treatments using biologically active molecules isolated from medicinal plants [1].

Solenostemma argel (Delile) Haynes (Asclepiadaceae) is a tropical plant that spreads through the central Sahara, in the Sinai and the southeastern desert. In Algeria, the species is widespread in the Central Sahara, Tassilin'Ajjer and the Hoggar Mountains [2]. It thrives mainly in rocky and sandy areas and in gravelly wadis, between an altitude of 500 and 1600 meters [3].

Among the local populations, the decoction of the aerial parts or leaves of *Solenostemma argel* (*S. argel*) is highly prized as febrifuge and purgative but also to treat colic, upset stomach, constipation, flatulence, urinary tract infections, renal pains and coughing [4]. In addition, infusion of aerial parts is used to treat diabetes and jaundice, and infusion of leaves and flowers is indicated to purify the blood and calm the nerves [3]. In Libya and Egypt, leaves decoction is taken to treat bronchitis, neuralgia and sciatica [5]. In Lebanon, the dried leaves of this plant are imported, and boiled in olive oil; this liquid is used in friction against rheumatism [3].

During the ethnobotany survey we conducted in Taman asset, southern Algeria, where the plant was harvested, we be witnesses of its use by the Hoggar people. Powdered dried leaves are boiled in milk, sweetened with dates or sugar, and the decoction is drunk to treat

rheumatism, gonorrhea and hemoptysis. We have been reminded that the fruits are instilled in the eyes to cure the flu states. Also, sap is used for the treatment of wounds. In addition, the branches of the plants are used in the waterers of animals to fight against harmful insects. Finally, the Hoggar people use the leaves and sap of the plant to produce natural soap (personal communication).

Due to their implication in almost all the human and animal diseases, inflammation and pain are widely studied by scientific community [6]. Inflammation, which is characterized by pain, redness, swelling and dysfunction of the tissues and organs, is the normal result of host protective responses to tissue injury caused by numerous stimuli. It is commonly associated with pain as a secondary process, resulting from the secretion of analgesic mediators [7]. Inflammation is like a double-edged sword because it is a host defense mechanism to eliminate invading pathogens and to initiate healing process, but the uncontrolled or the overproduction of inflammatory products can lead to injury of host cells, chronic inflammation, chronic diseases and neoplastic transformation [8]. Therefore, the inflammatory response must be actively controlled when no longer needed to prevent unnecessary harmful biological processes. Mechanisms, which serve to terminate inflammation, include various cellular and immunological responses and could be initiated using potential anti-inflammatory compounds, which worked specifically by inhibiting inflammatory components or activating transcription factors [9].

Steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs are widely prescribed because of their effectiveness in the management of pain and inflammation but their prolonged administration is known to be

associated with various side effects. Traditional medicine, which is based on the natural plants use, has already been declared by WHO as promotive, preventive, curative and rehabilitative [10]. In this context, the use of natural resources, and more particularly of medicinal plants, becomes a promising research voice to explore and discover effective drugs with fewer side effects.

With this work, we aimed to explore the composition of acetone extract from the leaves of *S. argel* (AESA) and to evaluate its antioxidant, anti-inflammatory and analgesic properties on in vivo models.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and drugs

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate, Aluminum chloride, 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), Carrageenan, acetic acid, formalin, acetone and the standard drugs indomethacin and morphine sulfate were purchased from Sigma Aldrich corporation (St. Louis, MO, USA). All chemicals and drugs used in this work were of analytical grade.

Collection and identification of plant

The aerial parts of *S. argel* were collected at an altitude of 1400 m between January and May 2016 at Oued Taghat, 120 km from the town of Tamanrasset (22° 47' 13" North, 5° 31' 38" East)-Algeria.

The plant aerial part was air dried at room temperature, in a dry and aerated place. The identification of the studied plant was carried out by professor Benhouhou of the botanical department of "Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie" (ENSA) of El-Harrach in Algiers, Algeria and she delivered us a certificate of identification.

Extract preparation

Briefly, 24 g of the plant leaves were ground to a fine powder and divided into units of 500 mg. Each unit was mixed with 5 ml of acetone using a vortex equipment for 5 min and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min. After decantation, the liquid phase was recovered and the residue was re-extracted two more times according to the same procedure. Finally, the liquid phases were assembled and dried using rotary evaporator at 40 °C leading to recover 1.171 g (4.87%) of extract from the starting plant material [11].

UHPLC analysis

The UHPLC system consisted of a variable loop of 20 microliters (2 ml vial capacity set at 5 °C), an LC pump and a PDA detector (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). The separation of the compounds was carried out with a gradient elution program at a flow rate of 0.2 ml/min, at 30 °C, by using a Hypersil Gold C18 column (100x2.1 mm; 1.9 µm) supplied by Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). The injection volume in the UHPLC system was 2 microliters and the mobile phase consisted in formic acid 0.1% (A) and acetonitrile (B). The following linear gradient was applied: 0–Xmin: X%B, X–Y min: 0–X%B, X–Y min: X–Y%B, followed by re-equilibration of the column for XX min before the next run. Online detection was carried out in the diode array detector, at XX and YY nm, and UV spectra in a range of 190–700 nm were also recorded. The HPLC was coupled to a LTQ XL Linear Ion Trap 2D mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA), equipped with an orthogonal electrospray ionization source operating in negative mode. The nitrogen sheath and auxiliary gas were 50 and 10 (arbitrary units), respectively. The spray voltage was 5 kV and the capillary temperature was 275 °C. The capillary and tune lens voltages were set at –28V and –115V, respectively. The data acquisition was carried out by using Xcalibur® data system (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA).

In vitro studies

Determination of total phenolics content

The total phenolic content of AESA was determined by the Folin-Ciocalteu assay [12]. A mixture of 0.2 ml of extract, 0.8 ml of distilled water and 0.1 ml of Folin-Ciocalteu reagent was first incubated at room temperature for 3 min. After the addition of 0.3 ml of 20% (w/v) Na₂CO₃, the mixture is further incubated at room temperature for 120

min and absorbance was measured at 765 nm. Total polyphenol content was calculated from a gallic acid calibration curve (5–100 µg/ml), and the result was expressed as mg of gallic acid equivalents (mg GAE/g). Any measurement is repeated three times.

Determination total flavonoids content

The quantification of flavonoids is estimated by the method of Aluminum Chloride [13]. The protocol followed consists of mixing 1 ml of extract with 1 ml of the 2% AlCl₃ solution prepared in methanol. After incubation of the mixture at room temperature for 10 min, the absorbances are measured at 440. The calibration curve was obtained with quercetin (2–20 mg/l). The total flavonoids content was expressed as mg of quercetin equivalents (mg EQ/g). Any measurement is repeated three times.

DPPH radical scavenging assay

The free radical scavenging activity of AESA was assessed using the stable radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The assay was performed according to the standard technique described by Blois [14]. In brief, 1 ml of methanolic DPPH solution (0.2 mmol) was added to 1 ml of the AESA and mixed well. The samples were incubated for 30 min in the dark at room temperature. The absorbance was measured at 517 nm. The radical scavenging activity was calculated using the following equation:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

Where A₀ represents the control absorbance and A₁ the absorbance of AESA. All measurements were performed in triplicate.

In vivo studies

Animals

Healthy wistar albino rats (150–200 g) and Swiss albino mice (20–30 g) of either sex were procured from the "Institut Pasteur d'Algérie". All animals were housed in an animal room under standard laboratory conditions of temperature (25±2 °C), relative humidity (55±1%), 12 h light/dark cycle, and fed with standard pelleted food and water *ad libitum*. The animals were acclimatized to laboratory environment for 7 d before starting experiments.

The study was permitted by the scientific council of "Santé et Productions Animales" Research Laboratory of the "Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire" of Algiers, and performed according to the international rules regarding animal experiments and biodiversity rights.

Acute toxicity study

Acute oral toxicity study was performed as per the guidelines of Organization for Economic Co-operation and Development (OECD-420) [15]. Nulliparous and non-pregnant healthy female rats were used for this study. The rats were divided into four groups with five animals in each group. Single dose of AESA (500, 1000 and 2000 mg/kg) was administered to overnight fasted rats, while control group received distilled water (10 ml/kg). The animals have been observed individually during the entire experimental period, for any behavioral and neurological changes as a sign of acute toxicity. For 14 d, the animals were weighed, and the number of deaths was reported. On the 14th day, Blood samples were taken to analyze some biochemical parameters. The animals were then sacrificed and autopsied and various organs (hearts, livers, kidneys, lungs and spleens) were weighed and collected for histopathological study. The organs were fixed in 10% formalin then dehydrated, diluted and incorporated into paraffin blocks. Slices 4 µm thick were produced and stained by hematoxylin-eosin (HE) techniques. The slides were observed with an optical microscope to highlight toxicity lesions.

Anti-inflammatory activity

Carrageenan-induced rat paw oedema

The anti-inflammatory effect of AESA against carrageenan induced acute paw edema in rats was conducted according to the method described previously [16].

Four groups of 6 rats each were treated with AESA (250 and 400 mg/kg, p. o.), indomethacin (10 mg/kg, p. o.) and distilled water (10

ml/kg, p. o.). One hour later after administration, acute inflammation was produced by the subplantar injection of 0.1 ml of 1% carrageenan in the left hind paw of the rats. The right hind paw served as reference non-inflamed paw for comparison. The paw diameter was measured with an electronic caliper in the dorsal plantar axis at the metatarsal level. For all the specimens, the paw diameters of rats were determined each hour until the 6th hour after injection of carrageenan. The difference between initial and post-treatment paw diameters indicates the degree of inflammation. Edema was expressed as a percent increase in paw diameter due to carrageenan administration referred to the reference paw (untreated paw). The average increase in paw diameter of each group was evaluated and compared with that of the control and the standard groups.

Cotton pellet induced granuloma

The granulomatous lesions were induced by surgically implanting two cotton pellets subcutaneously in the dorsal region of the rats, each one near each axilla. After 20 min of AESA administration, autoclaved sterile pellets of cotton, weighing 20 mg each one, were aseptically implanted in the interscapular distance under the skin on the previously shaved back of the rats in anesthetized condition. The rats were treated with AESA (250–400 mg/kg, p. o.), standard drug indomethacin (10 mg/kg, p. o.) and distilled water (10 ml/kg, p. o.) once daily for 7 days and on the eight day, all the rats were sacrificed and the pellets surrounded by granuloma tissue were dissected out carefully and dried at 70±1 °C. Mean weight of the granuloma tissue formed around each pellet was recorded. The pellets were weighed in both moist and dry condition. The weight of pellets taken out from AESA administered rats was compared with the weight of pellets taken out from the control group [17].

Analgesic activity

Writhing test in mice

The assay was performed according to the method previously described [18]. The nociceptive effect caused by injection of acetic acid was detected by observing abdominal writhing associated with stretching of the whole body. Four groups of 6 mice each were treated with AESA (250 and 400 mg/kg, p. o.), indomethacin (10 mg/kg p. o.) and distilled water (10 ml/kg, p. o.). Thirty minutes after treatment, 0.1 ml of 1% acetic acid solution were injected to the mice inducing the characteristic writhing. Animals were observed individually and the number of writhes started to be counted 5 min after injection of acetic acid and for 20 min. The significant reduction of writhes number of treated groups was compared to that of the control and standard groups. The inhibition

percentage was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{writhes number of control group} - \text{writhes number of treated group}}{\text{writhes number of control group}} \times 100$$

Formalin test

The formalin test was carried out as described previously [19]. Four groups of 6 rats each one were treated orally with distilled water (10 ml/kg), morphine (10 mg/kg) and AESA (250–400 mg/kg). One hour after treatment, rats were injected with 50 µl of 2.5% formalin (in 0.9% saline) into the sub plantar space of the right hind paw and the duration of paw licking was determined 0–5 min (first phase) and 20–25 min (second phase) after formalin injection.

Hot plate test

Four groups of 6 mice each one were treated with AESA (250 and 400 mg/kg, p. o.), morphine (10 mg/kg p. o.) and distilled water (10 ml/kg, p. o.). Animals in all groups were individually exposed to the hot plate. The time taken in seconds for fore paw licking or jumping was taken as reaction time and was measured in a regular time interval and the reaction strength of each rat was determined before and after drug treatment at 30 min, 60 min and 120 min. A cutoff period of 15 seconds was set up to prevent damage to the paws. The groups administered with tested extract were compared to control and standard drug groups [20].

Statistical analysis

All values were expressed as means±standard deviation. Data were analyzed by one way ANOVA followed by Tukey test multiple comparison. Results were considered statistically significant at P<0.05.

RESULTS

UHPLC analysis

A qualitative analysis of the composition of the AESA was performed using UHPLC/DAD/ESI-MS² operated in negative ionization mode. Fig. 1 illustrates the UHPLC base peak chromatogram recorded at 370 nm and in table 1 are summarized the most important data of the compounds (retention time, maximum wavelength, molecular ions species and fragments).

Determination of total phenolics and flavonoids content

The quantification of the total phenols and flavonoids of the acetone ESA extract is shown in table 2. The value of total phenolics was 10,955±0,352 mg gallic acid equivalent (GAE)/g extract and that of the total flavonoids was 38,855±0,289 mg rutin equivalent (RE)/g extract.

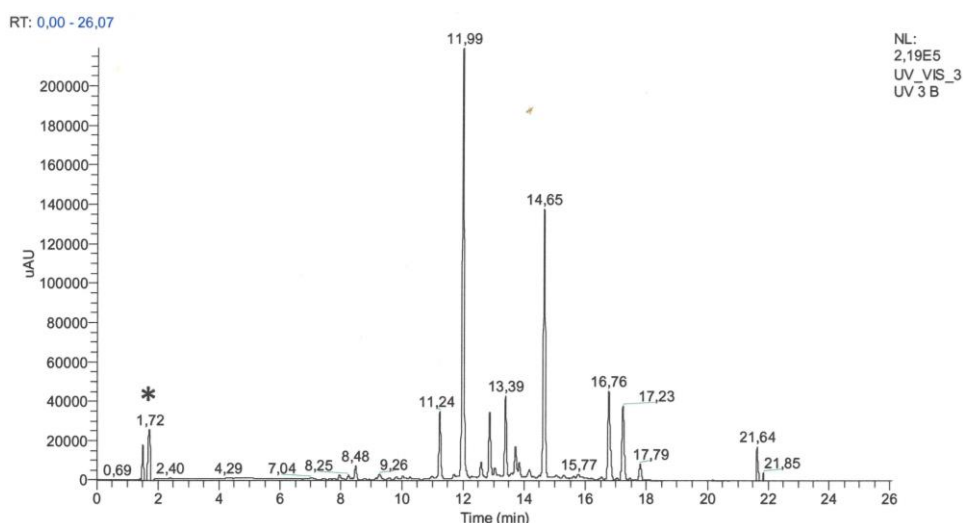


Fig. 1: UHPLC chromatogram of *S. argel* acetonic extract recorded at 370 nm (*solvent)

Table 1: Identification of UHPLC/DAD/ESI-MS² data from the acetonic extract of *S. argel*

Rt (min)	λ_{max}	[M-H] ⁻ (m/z) [*]	ESI-MS ²	Compound	References [*]
7.96	239, 270, 303	137	137 (100), 110 (65), 119 (90)	Salicylic acid derivative	[21, 22]
8.25	240, 268	137	137 (100), 110 (55), 119 (60)	Salicylic acid	[21, 22]
8.48	222, 267	1081	517 (100), 504 (60), 536 (25), 545 (20), 519 (15)	Saponin derivative	Tentative identification
11.24	256, 308, 355	609	300 (100), 301 (30), 445 (30), 489 (20), 463 (15), 271 (15), 255 (10)	Quercetin-3-O-rutinoside (Rutin)	[23, 24]
11.99	195, 265, 349	593	429 (100), 284 (70), 285 (50), 447 (20), 255 (15), 473 (15)	Kaempferol-3-O-rutinoside	[23, 25]
12.6	239, 268	771	607 (100), 427 (70), 285 (60), 713 (60)	Kaempferol-3-O-diglucoside-7-O-glucoside	[26, 27]
12.87	242, 265, 350	447	284 (100), 285 (90), 327 (35), 255 (10)	Kaempferol-3-O-glucoside (Astragalin)	[23, 24]
13.39	226, 282	1047	Not fragmented under the used conditions	Saponin derivative	Tentative identification
13.72	240, 272, 294	901	527 (100), 725 (90), 707 (80), 545 (70), 593 (60), 266 (60)	Saponin derivative	Tentative identification
13.84	241, 269, 299	1047	Not fragmented under the used conditions	Saponin derivative	Tentative identification
14.65	245	553	391 (100), 535 (50), 506 (20), 469 (20), 373 (30), 347 (20), 301 (20), 257 (15), 233 (15), 375 (10), 311 (10), 425 (10)	Quercetin derivative	Tentative identification
16.76	228, 271, 295, 324	693	341 (100), 385 (80), 353 (40), 649 (30), 661 (30), 485 (20), 557 (20), 609 (10), 301 (10), 249 (10)	Quercetin derivative	Tentative identification
17.23	243	137	137 (100), 110 (60), 119 (35)	Salicylic acid derivative	[21, 22]
17.79	243, 267, 364	285	285 (100)	Kaempferol	[25, 26]
21.64	244, 267	1159	275 (100), 211 (20), 235 (15), 265 (10)	Saponin derivative	Tentative identification
21.85	264	1053	747 (100), 891 (90), 1034 (70), 859 (60)	Stemmoside F	[28]

Rt: Retention time, λ_{max} : wavelength of maximum absorption in the UV-Vis region, ESI: electrospray ionization, pseudo molecular and MS² fragment ions and identification of compounds.*conform to the literature

Table 2: Quantification of total polyphenols, total flavonoids and DPPH scavenging activity of the acetone extract of *S. argel* leaves

Treatment	DPPH IC ₅₀ (μg/ml)	Total phenolics (mg GAE/g extract)	Total flavonoids (mg QE/g extract)
AESA	36.053±2,767	10.955±0,352	38.855±0,289
BHT	9.437±0,412	-	-

Values are expressed as means of triplicate determination±standard deviation (n=3). GAE: gallic acid equivalent; QE: quercetin equivalent.

Table 3: Results of the acute toxicity study of the acetone extract of *S. argel* leaves

Parameters	Treatment groups			
	Control	AESA 500 mg/kg	AESA 1000 mg/kg	AESA 2000 mg/kg
Body weight (g)				
0 d	183±1.224	182.8±1.303	183.4±1.140	183.6±1.140
7th day	183.6±4.393	188.4±3.361	182.4±5.412	185.8±2.168
14th day	191.4±2.880	194.2±5.805	191.6±3.781	191±6.364
Biochemical parameters of blood serum				
Urea (g/l)	0.446±0.073	0.465±0.168	0.483±0.188	0.493±0.071
Creatinine (mg/l)	11.306±0.380	9.754±1.268	8.652±1.639	9.256±3.988
ALP (U/l)	133.94±6.926	137.82±9.185	140.52±48.282	166.72±26.265
ALT (U/l)	51.78±4.745 ^a	54±4.952 ^a	55.056±8.798 ^a	70.24±5.312 ^b
AST (U/l)	62.16±6.447 ^a	66.3±7.886 ^{ab}	63.462±12.955 ^a	90.54±24.583 ^b
Total protein (g/l)	70.18±1.306	68.42±5.476	63.12±2.665	70.24±5.312
Albumin (g/l)	31.54±1.718	36.3±7.916	33.74±11.011	31.94±3.146
Organ weights (g)				
Liver	6.561±0.474	6.523±0.432	6.725±0.616	6.528±0.708
Kidney (Right)	0.540±0.022	0.535±0.026	0.536±0.011	0.582±0.084
Kidney (Left)	0.527±0.023	0.511±0.023	0.510±0.008	0.573±0.066
Spleen	0.660±0.027	0.639±0.034	0.677±0.070	0.777±0.121
Heart	0.644±0.033	0.630±0.027	0.661±0.027	0.578±0.065
Lungs	1.333±0.323	1.187±0.202	1.059±0.122	1.435±0.356

Values are expressed as mean±standard deviation (n=5). The numbers with the same letter show no significant difference after analysis of one-way ANOVA followed by Tukey test.

Antioxydant activity

The results of the DPPH scavenging activity of ESA are shown in table 2. The antioxidant activity of the acetone extract of *Solenostemma argel* leaves was evaluated by determining the IC₅₀ value. The result obtained shows that the ESA expresses a maximum radical scavenging activity with a IC₅₀ value of 36,053±2,767 µg/ml. However, the standard BHT exhibits higher activity with an IC₅₀ value of 9,437±0,412 µg/ml.

Acute toxicity study

The acute oral toxicity study of the AESA at the doses of 500, 1000 and 2000 mg/kg body weight did not produce any visible signs or symptoms of toxicity in rat. No behavioral changes or neurological toxicity were observed. A normal body weight gain was observed

and there was no significant difference in organ weights compared to the control group.

The biochemical constants revealed that in general no significant difference in the levels of blood serum parameters compared to control group was reported, however, an exception was observed for the ALT (P<0,001) and AST (P<0,03) values recorded in the rats treated at the dose of 2000 mg/kg (table 3).

Histopathological examination of the organs taken from the control rats revealed no lesion abnormalities. However, liver lesions detected in rats treated by AESA only appear at the dose of 1000 mg/kg and are represented by vascular congestion of sinusoids and rare foci of subcapsular steatosis (10% of parenchyma), while at 2000 mg/kg, degenerative lesions with foci of pycnosis were observed covering 25% of the parenchyma in 3 out of 5 cases (fig. 2).

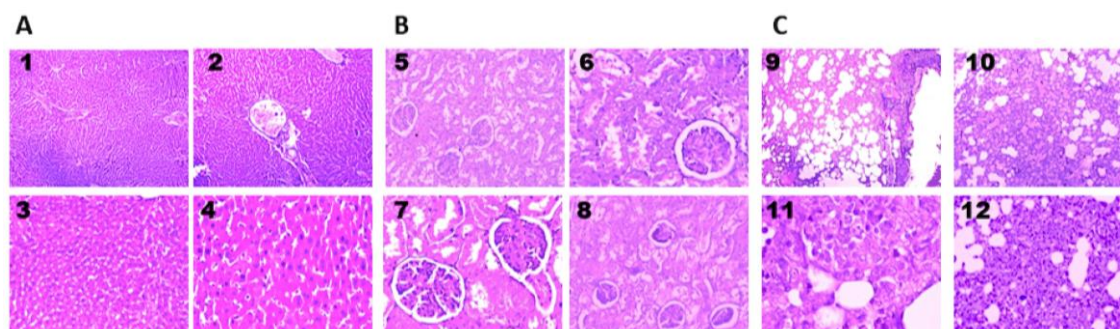


Fig. 2: Histopathological analysis of organs treated with acetone extract of *S. argel* leaves in the acute toxicity stained with hematoxylin and Eosin method (H and E). A. Liver. 1. Control: normal parenchyma x10; 2. AESA 500 mg/kg: normal parenchyma x20; 3. AESA 1000 mg/kg: subcapsular steatosis (10%) x20; 4. AESA 2000 mg/kg: Pycnosis and acidophilic degeneration (25%) x40. B. Kidney. 5. Control: normal parenchyma x10; 6. AESA 500 mg/kg: Tubular degeneration (20%)x40; 7. AESA 1000 mg/kg: Tubular degeneration (20%) and mesangial hypercellularity of flocculus x20; 8. AESA 2000 mg/kg: Tubular degeneration and mesangial hypercellularity (25%) x40. C. Lungs. 9. Control: normal parenchyma x10; 10. AESA 500 mg/kg: alveolitis (25%) x10; 11. AESA 1000 mg/kg: macrophagicalveolitis (25%) x40; 12. AESA 2000 mg/kg: macrophagicalveolitis and emphysema (25%) x10

Renal lesions begin to appear at the dose of 500 mg/kg in the form of toxic tubulitis covering 20% of the parenchyma, observed in one out of five cases. At the doses of 1000 mg/kg and 2000 mg/kg, the lesions are more extensive in the form of tubulitis with mesangial hypercellularity covering nearly 25% of the parenchyma in three out of five cases (fig. 2).

In addition, histopathological examination of the lungs revealed pulmonary lesions in the form of alveolitis at doses of 500 mg/kg, 1000 mg/kg and 2000 mg/kg covering 25% of the parenchyma. The frequency of occurrence of pulmonary lesions varies according to the doses administered, thus, it is one in five cases at the dose of 500

mg/kg, two cases out of five at the dose 1000 mg/kg and five cases out of five at a dose of 2000 mg/kg (fig. 2). Finally, histopathological examination of the spleen and heart revealed no toxic lesions.

Anti-inflammatory activity

Carrageenan-induced rat paw edema

As shown in table 4, the formation of paw edema in the control group was observed 1 hour after the carrageenan injection and continued to increase until the 3rd hour to stabilize between the 4th and the 6th h. Considering the control group, a significant difference of the edema formation was revealed in all treated groups (P<0.01).

Table 4: Effect of acetone extract of *S. argel* on carrageenan induced paw edema in rats

Treatment	Dose (mg/kg b.w.)	Edema rate (%)						
		T _{0h}	T _{1h}	T _{2h}	T _{3h}	T _{4h}	T _{5h}	T _{6h}
Control	(10 mg/kg b.w.)	0.29±0.03 ^a	0.57±0.01 ^a	0.65±0.01 ^a	0.46±0.02 ^a	0.37±0.01 ^a	0.36±0.01 ^a	0.36±0.01 ^a
Indomethacin	10	0.29±0.08 ^a	0.47±0.03 ^{ac}	0.37±0.01 ^b	0.22±0.00 ^{bc}	0.12±0.01 ^b	0.09±0.00 ^b	0.09±0.00 ^b
AESA	250	0.26±0.06 ^a	0.50±0.01 ^{ac}	0.41±0.01 ^b	0.28±0.01 ^c	0.18±0.00 ^b	0.12±0.01 ^b	0.11±0.01 ^b
AESA	400	0.25±0.04 ^a	0.40±0.01 ^{bc}	0.32±0.00 ^b	0.17±0.01 ^b	0.09±0.01 ^b	0.07±0.01 ^b	0.05±0.00 ^b

Values are expressed as mean±standard deviation (n=6). The numbers with the same letter show no significant difference after analysis of one-way ANOVA followed by tukey test.

Oral administration of AESA caused dose-dependent inhibition of edema formation between the 2nd and 6th hour after carrageen in injection at doses of 250 and 400 mg/kg, with maximal inhibition rates of 70.09% and 85.53% respectively, observed at the 6th hour. In addition, indomethacin 10 mg/kg showed a significant reduction in paw edema with an inhibition rate of 75.70% observed at the 5th

hour post inoculation (fig. 3). The inhibitory effect produced by AESA at doses of 250 and 400 mg/kg was comparable to that of standard at a dose of 10 mg/kg. However, a significant difference was observed between the two doses of AESA (P<0.01). The effects of AESA and indomethacin at the given doses were found also time-dependent all through to the 6th hour (P<0.0001) (fig. 3).

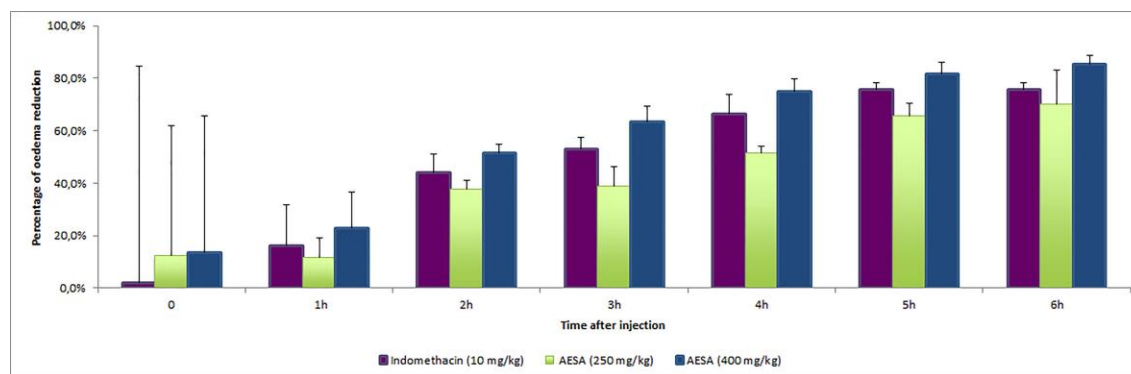


Fig. 3: Suppressive effect of acetone extract of *S. argel* on carrageenan induced paw edema in rats. Values are expressed as mean±standard deviation (n=6)

Cotton pellet induced granuloma

The effects of AESA and indomethacin on the proliferative phase of inflammation compared to the control group are shown in table 5 (P<0.01).

The anti-inflammatory effects recorded by AESA and the reference drug Indomethacin were evaluated on the basis of the wet and dry

weight of cotton pellets. Being wet, the proliferative effects of AESA at doses of 250 and 400 mg/kg and indomethacin (10 mg/kg) were calculated as 49.29, 67.74 and 68.46%, respectively. After drying, the inhibition percentages recorded by AESA at both doses (250 and 400 mg/kg) and indomethacin (10 mg/kg) are 52.63, 70.58 and 68.78%, respectively. At a dose of 400 mg/kg, AESA exhibits an inhibitory effect similar to that of the standard drug indomethacin (P = 0.918) (table 5).

Table 5: Effect of acetone extract of *S. argel* on cotton pellets induced granuloma in rats.

Treatment	Dose (mg/kg bw)	Weight of cotton pellet (mg) (moist)	% inhibition	Weight of cotton pellet (mg) (dried)	% inhibition
Control	10	530.975±39.788 ^a	-	103.566±2.916 ^a	-
Indomethacin	10	167.041±16.674 ^b	68.46 ^a	32.185±6.558 ^b	68.78 ^a
AESA	250	269.116±19.717 ^c	49.29 ^b	49.025±5.363 ^b	52.63 ^b
AESA	400	170.416±1.756 ^b	67.74 ^a	30.441±1.020 ^b	70.58 ^a

Values are expressed as mean±Standard deviation (n=6), the numbers with the same letter show no significant difference after analysis of one-way ANOVA followed by Tukey test.

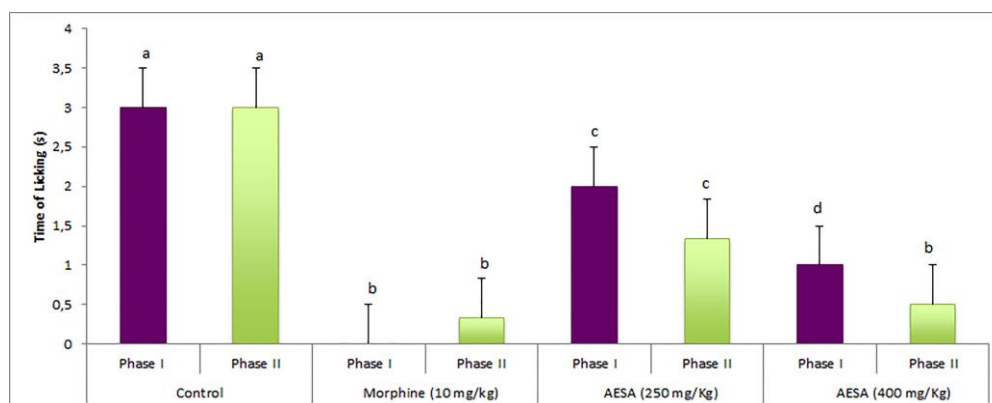


Fig. 4: Effect of acetone extract of *S. argel* on formalin-induced nociception in rats. Values are expressed as mean±standard deviation (n=6). The numbers with the same letter show no significant difference after analysis of one-way ANOVA followed by tukey test

Analgesic activity

Writhing test in mice

The effect of AESA on acetic acid-induced abdominal writhing in mice is shown in table 6. The plant extract and standard inhibited significantly the acetic acid-induced abdominal writhing response when compared to the control group. In addition, the AESA exhibited a significant and dose-dependent anti-nociceptive effect at doses of 250 and 400 mg/kg with a percentage of cramps inhibition of 56.83 and 80.41%, respectively. Indomethacin (10 mg/kg) showed a protective effect (78.93% inhibition) comparable to that of AESA at the highest dose (400 mg/kg).

Formalin test

The time of licking recorded after injection of 2.5% formalin was compared with results of control group and the results are shown in fig. 4. Oral administration of AESA at doses of 250 and 400 mg/kg caused a significant and dose-dependent anti-nociceptive effect in both phases of formalin test. In the early phase, the inhibition rate reached 33.3 and 66.7% respectively, meanwhile in the last phase; the inhibition rate was 55.6 and 83.3% respectively considering the control group. In addition, the positive control: morphine (10 mg/kg) showed a powerful anti-nociceptive activity in both phases with an inhibition rate of 100 and 88.9% in the early and last phases in that order. The protective effect generated in last phase by AESA

at dose of 400 mg/kg was comparable to that of morphine at 10 mg/kg (fig. 4).

Hot plate test

Anti-nociceptive activities of AESA in the pain model induced with a hot plate are depicted in fig. 5. Considering the control group, AESA at dose of 400 mg/kg has impacted the pain latency all along the

time points studied ($P < 0.01$), unlike the 250 mg/kg dose, which has a non-significant difference at the measurement time of 120 min ($P = 0.079$) (fig. 5). In contrast, morphine (10 mg/kg), used here as a standard drug, significantly prolonged the hot-plate latency and showed a powerful anti-nociceptive effects all through to the time points studied compared to control and AESA at doses of 250 and 400 mg/kg ($P < 0.01$) (fig. 5).

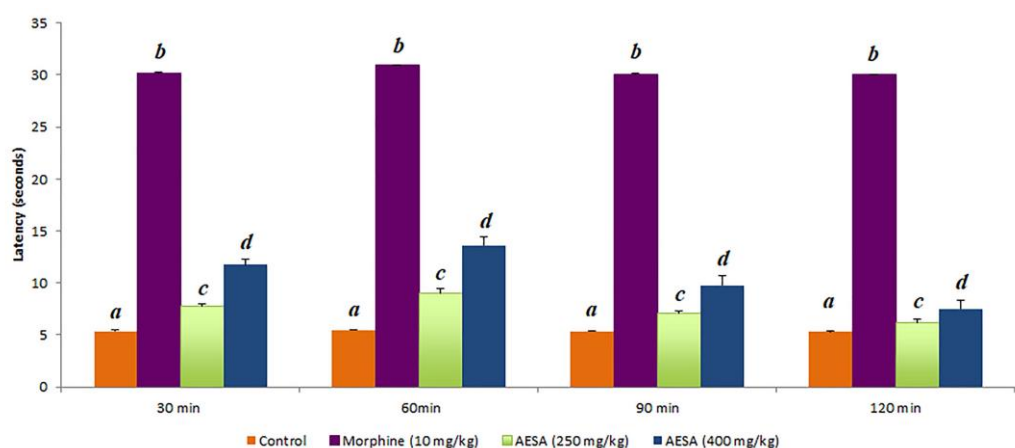


Fig. 5: Effect of acetone extract of *S. argel* on hot plate induced nociception in mice. Values are expressed as mean $\pm$ standard deviation (n=6). The numbers with the same letter show no significant difference after analysis of one-way ANOVA followed by tukey test

DISCUSSION

The profile of the acetone extract of the leaves of *S. argel* was established by UHPLC/DAD/ESI-MS² analysis and the following compounds could be identified on the basis of their UV spectrum, m/z and MS² fragmentation in accordance with the literature: Salicylic acid and its derivatives, Quercetin-3-*O*-rutinoside (Rutin), Kaempferol-3-*O*-rutinoside, Kaempferol-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside, Kaempferol-3-*O*-glucoside (Astragalin), Kaempferol, Stemmoside F and Saponin derivative (table 1). Two peaks at retention times of 14.65 and 16.76 min, were detected at m/z 553 and m/z 693 respectively, showed in their MS² fragment ions at m/z 301 corresponding to quercetin moiety, which suggested that, these compounds were quercetin derivative.

In preliminary investigations of the plant, kaempferol [29], quercetin, rutin and an unknown saponin [30] have been isolated. The flavonol glycoside kaempferol-3-*O*-rutinoside and the aglycone kaempferol were identified as chemical constituents of *S. argel* leaves [31]. Kaempferol-3-*O*-rutinoside and kaempferol-3-*O*-glucoside (astragalin) were found in the methanolic extract of *S. argel* leaves [4]. In addition, Hassan *et al.* recognized the richness of *Solenostemma argel* species in saponins [32]. These data corroborate with the results found in our study.

The radical scavenging activity of DPPH is considered as reliable test for assessing the antioxidant potential of a compound because it is extremely sensitive and accurate [33]. The obtained results suggest the presence of components having the ability to interact with free radicals by acting as an electron donor or hydrogen atoms. Flavonoids and phenolic components are natural antioxidant substances capable of scavenging free superoxide radicals [34]. Indeed, the richness of the AESA in flavonoids such as rutin, Kaempferol-3-*O*-rutinoside, Kaempferol-3-*O*-diglucoside-7-*O*-glucoside, Astragalin and Kaempferol could explain the observed antioxidant effect. Quercetin and rutin being potent antioxidants can freely donate electrons or hydrogen to neutralize the reactive oxygen species (ROS) [35]. The strong antioxidative capacity of rutin has been proven by numerous studies, which reported its excellent scavenging activity [35, 36]. The potent antioxidant activity of rutin is mainly due to the presence of phenolic rings and free hydroxyl groups in the chemical structure acting as hydrogen donor to prevent further oxidation [36]. Likewise, kaempferol has been

reported to have excellent antioxidant activity and to react with H₂O₂, superoxide, and peroxy radical *in vitro* [37]. Kaempferol-3-*O*-rutinoside and Kaempferol-3-*O*-glucoside were suggested to have considerable antioxidant activity mediated by reduction of oxidative stress [38].

During the acute toxicity test period of AESA, daily monitoring of body weight revealed a progressive gain in weight of the rats tested. No evidence of morbidity or mortality was observed during the experiment indicating a good apparent tolerance of acetone extract of *S. argel* by the rats. In this study, no alterations in biochemical analyzes were observed after extract-treated except for the ALT and AST parameters recorded in rats treated at a dose of 2000 mg/kg. Increased levels of ALT and AST may be a consequence of liver toxicity. Indeed, increases in the levels of AST and ALT in the serum are associated with liver toxicity by drugs or any other hepatotoxin [39].

The assessment of pathological changes in the organs of treated animals, both macro and microscopically, is the basis of a safety assessment [40]. Macroscopic analysis of AESA-treated rats at all doses tested produced no changes in vital and reproductive organs during the qualitative analysis. During histological examination, no serious aberration in the structural integrity of the organs studied was recorded after administration of the extract at doses of 500 mg/kg body weight. However, administration of AESA at doses of 1000 mg/kg and 2000 mg/kg resulted in pathological changes in the liver, kidneys and lungs. These results demonstrate the possible oral toxicity of *S. argel* acetone extract at high doses of 1000 mg/kg and 2000 mg/kg.

The study of the anti-inflammatory activity of the acetone extract of AESA was carried out by two experimental models, *i.e.*, carrageenin-induced rat paw oedema and cotton pellet-induced granuloma model. Carrageenin-induced rat paw oedema is a widely used test to evaluate the anti-inflammatory activity [41]. Carrageenin is known to produce a biphasic response [42]. Studies on the release of pharmacologically active substances during carrageenin inflammation have shown that, the first phase (0 to 2 h after injection of carrageenin) of oedema is attributed to release of histamine and 5-hydroxytryptamine, while the second phase (3 to 6 h after injection of carrageenin) is mediated by prostaglandin like substances, especially those of the E series. The precursor of both PGs and thromboxanes is PGH₂, derived from arachidonic acid by

the action of cyclooxygenase (COX) enzymes. Continuity between two phases is maintained by kinin like substances notably the endogenous nonapeptide bradykinin produced by kallikrein [41, 43]. AESA leads to a significant reduction in oedema formation between the 2nd and 6th hour after carrageenin injection. This result shows that AESA is efficient all along intermediate and second phases of the inflammatory response. Therefore, the anti-inflammatory activity of AESA may be due to the inhibition of the release of anti-inflammatory mediators occurring during the intermediate and second phases of edema formation, such as bradykinin and prostaglandins.

The cotton pellet-induced granuloma is widely used to evaluate the transudative and proliferative components of chronic inflammation [44]. Chronic inflammation is characterized by monocyte infiltration, fibroblast proliferation, angiogenesis, and exudation [45]. The weight of the wet cotton pellets correlates with transudate material and the weight of dry pellet correlates with the amount of granulomatous tissue. AESA at both doses tested (250 and 400 mg/kg), showed significant inhibition of cotton pellet granuloma formation. This result indicates that *S. argel* acetone extract displayed anti-inflammatory activity in the chronic phase of inflammation. The extract showed decrease in granuloma formation that reflected its efficacy to reduce increased level of fibroblasts and synthesis of collagen with mucopolysaccharide, which are natural proliferative events of granulation tissue formation [17].

The anti-inflammatory effect of the acetone extract of *S. argel* leaves could be due to the presence in the extract of flavonoids, especially rutin, Kaempferol-3-O-rutinoside, Kaempferol-3-O-diglucoside-7-O-glucoside, Astragalin and Kaempferol. Several mechanisms of action have been proposed to explain *in vivo* flavonoid anti-inflammatory actions, such as antioxidant activity, inhibition of eicosanoid generating enzymes or the modulation of the production of proinflammatory molecules [46].

Kaempferol and some glycosides of kaempferol have a wide range of pharmacological activities, including anti-inflammatory effect [37]. The study by Kaempferol has anti-inflammatory effect by interfering with NF- κ B pathway. NF- κ B is a transcription factor, which plays a key role in inflammation since it is responsible for the expression of various proinflammatory and proliferative genes, such as interleukins tumor necrosis factors, interferons and cyclooxygenases [47]. Rutin could be a potential candidate for COX-2 inhibition with a unique mechanism of action and could also inhibit the transcription of more than 20 genes coding for pro-inflammatory factors critics, including TNF- α , IL-1, IL-8 and migration inhibitory factor [36]. Astragalin has been reported as effective anti-inflammatory agent. Indeed, the anti-inflammatory properties of astragalin showed a significant inhibition of cellular NO, PGE₂ and IL-6 production [48]. The recorded anti-inflammatory effect can also be attributed to the presence in the acetone extract of *S. argel* of saponin derivatives. In fact, the anti-inflammatory activity of saponins has been known for a long time and is closely related to the core aglycone [49].

The mechanisms considered for the anti-inflammatory activity of saponin include a corticoidmimetic activity inhibiting the degradation of the glucocorticoid and the release of mediators of inflammation, inhibition of enzyme formation and inhibition increased vascular permeability [50]. The glucocorticoid-like effects of saponins have been shown to antagonize the transcription factor NF- κ B [51].

The study of the anti-nociceptive activity of AESA was carried out by three experimental models, *i.e.*, acetic acid-induced abdominal writhing in mince, formalin-induced nociception in rats and hot plate induced nociception in mice. The writhing test in mice is a chemical method used to cause peripheral pain by intraperitoneal injection of an irritating substance like acetic acid. The analgesic effect of the tested drugs is inversely proportional to the frequency of the observed writhes. The data presented in table 6 indicated that AESA at both doses (250 and 400 mg/kg) tested significantly reduced the chemical pain induced by acetic acid in mice in a dose-dependent manner. AESA at the highest dose (400 mg/kg) showed a nociceptive effect comparable to that of indomethacin (10 mg/kg), which served as a standard in this case. The intraperitoneal injection of acetic acid causes the release of prostanoids, particularly PGE₂,

PGF₂, bradykinin, serotonin, lipoxygenase in the in peritoneal fluids [10]. Prostaglandins activate and sensitize peripheral chemo sensitive nociceptive receptors, leading to the induction of abdominal constrictions that are accompanied by extension of the forelimbs and elongation of the body [52]. Therefore, the nociceptive activity of AESA may be due to inhibition of prostaglandin synthesis.

The formalin test is a valid and reliable model of nociception and is sensitive for various classes of analgesic drugs [53]. This test produced a distinct biphasic nociceptive response, which can be separated in time [7]. The first phase (from 0 to 5 min after injection of formalin) results from a direct stimulation of nociceptors. SubstanceP, glutamate and bradykinin are thought to participate in this phase, which is believed to be non-inflammatory pain. The second phase (from 15 to 30 min) is thought to be an inflammatory response with associated inflammatory pain, a process in which several inflammatory mediators are believed to be involved, including histamine, serotonin, prostaglandins and bradykinin [19, 52, 54]. AESA showed a significant dose-dependent effect on both phases of formalin-induced pain compared to the control group (fig. 4). Data obtained following the formalin test corroborates with those obtained from the hot-plate test and writhing test. This property of AESA may be due to inhibition of the synthesis or action of kinin and prostaglandins.

The hot plate test is useful for the evaluation of centrally acting analgesics, which are known to elevate the pain threshold of mice towards heat [55] and is thought to involve opioids and measures the complex response to a non-inflammatory, acute nociceptive input [56]. This test has often been used to assess central anti-nociceptive activity due to its several advantages, particularly its sensitivity to strong analgesics and the fact that tissue damage that it imposes is limited [42]. AESA had significant effect on pain latency with a maximum inhibition rate of 59.70% recorded at 60 min at a dose of 400 mg/kg compared to the control group (fig. 5). This anti-nociceptive action confirms the central activity observed in the first phase of formalin test. Furthermore, standard drug morphine, centrally acting analgesic that is exert an action on opioid receptors, was associated with a very significant anti-nociceptive effect, with an inhibition rate of 82.33%.

The present study has demonstrated the analgesic effect of the acetonic extract of *S. argel* leaves on peripheral and central pain, which suggests the presence in the extract compounds with anti-nociceptive property that could act on the kinin and prostaglandin pathways. Several flavonoids isolated from medicinal plants have been discovered to possess significant analgesic and anti-inflammatory effects [57]. The registered analgesic activity may be due to the presence in the acetone extract of *S. argel* leaves of certain flavonoids such as rutin, kaempferol-3-O-rutinoside, kaempferol-3-O-glucoside and kaempferol. Indeed, the antinociceptive effect of kaempferol-3-O-rutinoside and kaempferol-3-O-glucoside was demonstrated in different antinociceptive tests including the acetic acid-induced writhing and formalin test [38]. Other work, revealed the potential analgesic activity of the two flavonoids kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside on peripheral pain according to the model of cramps induced by acetic acid [58]. In addition, the study conducted by Hernandez-Leon *et al.* [59] provide evidence that rutin produces systemic anti-nociceptive effects involving central modulation of the ventrolateral periaqueductal grey matter (vlPAG) descending circuit, where this pharmacological action is partially mediated by an opioidergic mechanism. Moreover, analgesic effect of rutin was studied by hot plate test on Swiss albinomice. Further, it was also confirmed that rutin demonstrated peripheral and central anti-nociceptive activities [60]. The nociceptive effect can also be attributed to the presence of salicylic acid in the *S. argel* acetone extract. Indeed, the salicylic acid may contribute to the modulation of pain by inhibiting reactions induced by cytokines, salicylates interaction with heat shock proteins, and influences on genetics expression of proteins associated with inflammation [61]. In addition, salicylic acid covalently modifies COX by acetylating a serine residue positioned in the arachidonic acid-binding channel of the enzyme (Ser529 of COX-1 and Ser516 of COX-2), thus irreversibly inactivating it and preventing the generation of prostaglandins and thromboxane A₂ [62].

The presence of saponin derivatives in the acetone extract of *S. argel* leaves may also contribute to the observed analgesic effect. Indeed, several studies have demonstrated the analgesic effect of saponins on peripheral and central pain using the writhing test, the formalin test and the hot-plate test [62, 64-66]. Many saponins tested have displayed significant anti-nociceptive activity possibly due to their nonglycosidic moiety, the sapogenin [64]. The suggested mechanism involved in the analgesic activity of saponin is the blockage of the release of bradykinin, Prostaglandin, and cytokines [66].

CONCLUSION

The present study shows that acetonic extract from the leaves of *S. argel* displayed significant antinociceptive and anti-inflammatory properties, providing a scientific basis for its ethnobotanical uses for alleviating pain and treating inflammatory disorders among Sahara people in Algeria.

FUNDING

Thanks are due to the University of Aveiro and FCT/MCT for the financial support for the QOPNA research Unit (UID/UI/00062/2019) through national funds and, where applicable, co-financed by the FEDER, within the PT2020 Partnership Agreement.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

DKB was the main investigator performing the manipulations and writing the draft of the manuscript. DCGAP supervised the chromatography experiments. BC contributed to the redaction and the corrections of the manuscript. SZ performed the statistics. KBB was supervised the pathological anatomy experiments and the interpretation of the results. MHBM was the promotor of this work.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interests.

REFERENCES

- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 2004;70:93-103.
- Benhouhou S. *Solenostemma argel* (Del.) Hayne. In: A guide to medicinal plants in North Africa. Centre for Mediterranean Cooperation, International IU CN; 2005.
- Gurib Fakim A, Schmelzer GH. Ressources vegetales de l'Afrique tropicale: plantes medicinales 2. Fondation PROTA/CTA, Wageningen, The Netherlands; 2013.
- Innocenti G, Dall'Acqua S, Sosa S, Altinier G, Della Loggia R. Topical anti-inflammatory activity of solenostemmaargel leaves. *J Ethnopharmacol* 2005;102:307-10.
- Jabeen F, Tharib SM, Veitch GBA. An investigation of the anti-inflammatory activity of *Solenostemma argel*. *Fitoter* 1984; 55:186-9.
- Ibrahim B, Sowemimo A, van Rooyen A, Van de Venter M. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of cyathulaprostrata (Linn.) blume (Amaranthaceae). *J Ethnopharmacol* 2012;141:282-9.
- Wang QS, Yang L, Cui WY, Chen L, Jiang YH. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of methanol extract from aerial part of *Phlomis younghusbandii* Mukerjee. *PLoS One* 2014;9:E89149.
- Fangkrathok N, Junlatat J, Sripanidkulchai B. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of lentinuspolychrous extract. *J Ethnopharmacol* 2013;14:631-7.
- Ibrahim Abdelwahab S, Syaed Koko W, Mohamed Elhassan Taha, M Mohan S, Achoui M, Ameen Abdulla M, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activities of columbin through the inhibition of cyclooxygenase-2 and nitric oxide but not the suppression of NF- κ B translocation. *Eur J Pharmacol* 2012;678:61-70.
- Bhattacharya A, Naik MR, Divya A, Rath K, Kumar S, Mishra SS. Antipyretic, anti-inflammatory, and analgesic effects of leaf extract of drumstick tree. *J Young Pharm* 2014;6:20-4.
- Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *J Ethnopharmacol* 1998;60:1-8.
- Waterhouse AL. Determination of total phenolics. In: Wrolstad RE. editor. Current protocols in food analytical chemistry Wiley; 2002. p. 461-70.
- Quettier Deleu C. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat hulls and flour. *J Ethnopharmacol* 2000;72:35-42.
- Blois MS. Antioxydant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958;181:199-200.
- OCDE. Test No. 420: Acute oral toxicity-fixed dose procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Editions OCDE, Paris; 2002. <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;111:544-7.
- Sengar N, Joshi A, Prasad SK, Hemalatha S. Anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic activities of standardized root extract of *jasminumsambac*. *J Ethnopharmacol* 2015;160:140-8.
- Koster R, Anderson M, De Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 1959;18:412-7.
- Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non inflammatory pain. *Pain* 1987;30:103-14.
- Tasleem F, Azhar I, Ali SN, Perveen S, Mahmood ZA. Analgesic and anti-inflammatory activities of piper nigrum L. *Asian Pac J Trop Med* 2014;7S1:S461-S468.
- Ibrahim RM, El-Halawany AM, Saleh DO, El Naggar EMB, El-Shabrawy A, El-Rahman O, et al. HPLC-DAD-MS/MS profiling of phenolics from securigerasecuridaca flowers and its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities. *Rev Bra Farm* 2015;25:134-41.
- Kammerer B, Kahlich R, Biegert C, Gleiter C, Heide L. HPLC-MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations. *Phytochem Anal* 2005;16:470-8.
- Chen Y, Yu H, Wu H, Pan Y, Wang K, Jin Y, et al. Characterization and Quantification by LC-MS/MS of the chemical components of the heating products of the flavonoids extract in pollen typhae for transformation rule exploration. *Molecules* 2015;20:18352-66.
- Singh AP, Wang Y, Olson RM, Luthria D, Banuelos GS, Pasakdee S, et al. LC-MS-MS analysis and the antioxidant activity of flavonoids from eggplant skins grown in organic and conventional environments. *Food Nut Sci* 2017;8:873-88.
- Monagas M, Garrido I, Lebron Aguilar R, Bartolome B, Gomez Cordoves C. Almond (*Prunusdulcis* (Mill.) D. A. Webb) skins as a potential source of bioactive polyphenols. *J Agric Food Chem* 2007;55:8498-507.
- Llorach R, Gil-Izquierdo A, Ferreres F, Tomas Barberan FA. HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids fromcauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) agroindustrial byproducts. *J Agric Food Chem* 2003;51:3895-9.
- Harbaum B, Hubbermann EM, Wolff C, Herges R, Zhu Z, Chwarz K. Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*brassica campestris* l. ssp. chinensis var. communis) by HPLC-ESI-MSn and NMR and their quantification by HPLC-DAD. *J Agric Food Chem* 2007;55:8251-60.
- Plaza A, Perrone A, Balestrieri ML, Felice F, Balestrieri C, Hamed Arafa I, et al. New unusual pregnane glycosides with antiproliferative activity from *Solenostemmaargel*. *Steroids* 2005;70:594-603.
- Kamel MS, Ohtani K, Hasanain HA, Mohamed MH, Kasai R, Yamasaki K. Monoterpene and pregnane glucosides from solenostemmaargel. *Phytochem* 2000;53:937-40.
- El-Fishawy A. A pharmacognostical study of solenostemmaargel hayne growing in Egypt. A Master Thesis, Faculty of Pharmacy, Cairo University, Egypt; 1976.
- Michael HN. Chemical investigations on the leaves of solenostemmaargel [Del.] hayne. *Asian J Chem* 1998;10:1038.
- Hassan HA, Hame AI, El-Emary NA, Springue IV, Mitome H, Miyaoka H. Pregnene derivatives from solenostemmaargel leaves. *Phytochemistry* 2001;5:507-11.
- Koleva II TA, van Beek TA, Linssen JP, de Groot A, Evstatieva LN. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Anal* 2002;13:8-17.

34. Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. *J Med Plants Res* 2011;5:6697-703.
35. Sikder K, Kesh SB, Das N, Manna K, Dey S. The high antioxidative power of quercetin (aglycone flavonoid) and its glycone (rutin) avert high cholesterol diet induced hepatotoxicity and inflammation in swiss albino mice. *Food Funct* 2014;5:1294.
36. Chua LS. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 2013; 150:805-17.
37. Tsai MS, Wang YH, Lai YY, Tsou HK, Liou GG, Ko JL, *et al.* Kaempferol protects against propacetamol-induced acute liver injury through CYP2E1 inactivation, UGT1A1 activation, and attenuation of oxidative stress, inflammation and apoptosis in mice. *Toxicol Lett* 2018;290:97-109.
38. Wang Y, Chen P, Tang C, Wang Y, Li Y, Zhang H. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *carthamus tinctorius* L. *J Ethnopharmacol* 2014;151:944-50.
39. Ramaiah SK. Preclinical safety assessment current gaps, challenges and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver damage. *Clin Lab Med* 2011;31:161-72.
40. Prabu PC, Panchapakesan S, Raj CD. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the hydroalcoholic extract of *Withaniasomniferaroots* in wistar rats. *Phytother Res* 2013;27:1169-78.
41. Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* 1971;104:15-29.
42. Vinegar R, Schreiber W, Hugo RJ. Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1969;166:96-103.
43. Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, McKenzie KK. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hindlimb of the rat. *Fed Proc* 1987;46:118-26.
44. Winter CA, Porter CC. Effect of alterations in the side chain upon anti-inflammatory and liver glycogen activities of hydrocortisone esters. *J Am Pharm Assoc* 1957;46:515-9.
45. Meshram GG, Kumar A, Rizvi W, Tripathi CD, Khan RA. Evaluation of the anti-inflammatory activity of the aqueous and ethanolic extracts of the leaves of *albizia lebeck* in rats. *J Tradit Complement Med* 2015;6:172-5.
46. Garcia Lafuente A, Guillon E, Villares A, Rostagno MA, Martinez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflam Res* 2009;58:537-52.
47. Kadioglu O, Nass J, Saeed ME, Schuler B, Efferth T. Kaempferol is an anti-inflammatory compound with activity towards NF- κ B pathway proteins. *Anticancer Res* 2015;35:2645-50.
48. Lee HB, Kim EK, Park SJ, Bang SG, Kim TG, Chung DW. Isolation and anti-inflammatory effect of astragalosin synthesized by enzymatic hydrolysis of tea seed extract. *J Sci Food Agric* 2011;91:2315-21.
49. Barbosa P. An overview on the biological and pharmacological activities of saponins. *Int J Pharm Pharm Sci* 2014;6:47-50.
50. Matsuda H, Samukawa K, Kubo M. Anti-inflammatory activity of ginsenoside Ro1. *J Planta Med* 1990;56:19-23.
51. Haridas V, Arntzen CJ, Gutterman JU. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *acacia victoriae* (Benth.), inhibit activation of nuclear factor- κ B by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:11557-62.
52. Zhao J, Fang F, Yu L, Wang G, Yang L. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of croton crassifolius ethanol extract. *J Ethnopharmacol* 2012;142:367-73.
53. Temponi Vdos S, Da Silva JB, Alves MS, Ribeiro A, De Jesus Ribeiro Gomes de Pinho J, Yamamoto CH, *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of ethanol extract from *vernoniapolyanthes* leaves in rodents. *Int J Mol Sci* 2012;13:3887-99.
54. Xu Q, Wang Y, Guo S, Shen Z, Wang Y, Yang L. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *flospopuli*. *J Ethnopharmacol* 2014;152:540-55.
55. Hiruma Lima C, Gracioso J, Bighetti E, Germosen Robineou L, Souza Brito A. The juice of fresh leaves of *Boerhaaviadiffusa* L. (Nyctaginaceae) markedly reduces pain in mice. *J Ethnopharmacol* 2000;71:267-74.
56. Zakaria ZA, Ghani ZDFA, Nor RNSRM, Gopalan HK, Sulaiman MR, Jais AMM, *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory, and antipyretic properties of an aqueous extract of *dicranopterislinearis* leaves in experimental animal models. *J Nat Med* 2008;62:179-87.
57. Eldahshan OA, Abdel-Daim MM. Phytochemical study, cytotoxic, analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activities of *strychnosnux-vomica*. *Cytotechnology* 2015;67:831-44.
58. Parveen Z, Deng Y, Saeed R, Dai MK, Ahamad W, Yu YH. Antiinflammatory and analgesic activities of thesiumchinense turcz extracts and its major flavonoides, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. *Yakugaku Zasshi* 2007;127:1275-9.
59. Hernandez Leon A, Fernandez Guasti A, Gonzalez Trujano ME. Rutinantinociception involves opioidergic mechanism and descending modulation of ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. *Eur J Pain* 2016;20:274-83.
60. Ganeshpurkar A, Saluja A. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharm J* 2017;25:149-64.
61. Steen KH, Reeh PW, Kreysel HW. Topical acetylsalicylic, salicylic acid and indomethacin suppress pain from experimental tissue acidosis in human skin. *Pain* 1995;62:339-47.
62. Corazzi T, Leone M, Maucci R, Corazzi L, Gesele P. Direct and irreversible inhibition of cyclooxygenase-1 by nitroaspirin (NCX 4016). *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:1331-7.
63. Choi J, Jung HJ, Lee KT, Park HJ. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the saponin and sapogenins obtained from the stem of *akebiaquinata*. *J Med Food* 2005;8:78-85.
64. Arrau S, Delporte C, Cartagena C, Rodriguez Diaz M, Gonzalez P, Silva X, *et al.* Antinociceptive activity of quillajasaponaria mol saponin extract, quillaic acid and derivatives in mice. *J Ethnopharmacol* 2011;133:164-7.
65. Yassin NZ, Melek FR, Selim MA, Kassem IAA. Pharmacological activities of saponin containing fraction derived from *gleditsiacaspica* desmethanolic fruit extract. *Pharm Lett* 2013;5:247-53.
66. Saleh DO, Kassem I, Melek FR. Analgesic activity of *gleditsia triacanthos* methanolic fruit extract and its saponin-containing fraction. *Pharm Biol* 2016;54:576-80.