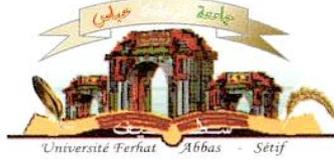


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2016

THÈSE

Présentée par

ADJADJ Moufida

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante
médicinale *Paronychia argentea* L.**

Soutenue publiquement le/...../2016

DEVANT LE JURY

Président	Dahamna Saliha	Pr.	UFA Sétif 1
Directeur	Baghiani Abderrahmane	Pr.	UFA Sétif 1
Examineurs	Khelifi Touhami Fatima	Pr.	Univ Constantine 1
	Laroui Saleh	Pr.	Univ Batna
	Khettal Bachra	MCA.	Univ Bejaia

Laboratoire de Biochimie Appliquée

DEDICACE

Je dédie ce travail à mes parents, qu'ils trouvent ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour leur soutien tout au long de mes études.

À mon mari, pour sa patience, son soutien et ses nombreux encouragements.

À mes sœurs et frères, et à toute la famille.

REMERCIEMENTS

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Je voudrais remercier Professeur BAGHIANI Abderrahmane pour avoir accepté de m'encadrer, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour ses conseils très importants durant toute la période de cette recherche. Qu'il trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.

Je remercie Professeur DAHAMNA Saliha d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie également Professeur KHELIFI TOUHAMI Fatima de l'Université Constantine 1, et Docteur Khettal Bachra Maître de Conférences de l'Université de Batna, ainsi que Professeur Laroui Saleh de l'Université de Batna, pour avoir accepté de bien vouloir examiner et juger ce travail.

Je tiens à remercier Professeur ARRAR Leħmici de l'Université F.A. Sétif 1, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour sa disponibilité cordiale et ses précieux conseils.

Mes sentiments de reconnaissances et mes remerciements vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Je remercie mes collègues et mes amies pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble.

ملخص

Paronychia argentea المعروفة باسم "بساط الملوك أو كسّارة الحجر"، تستعمل في الطب الشعبي الجزائري لعلاج تقرحات المعدة و أمراض البطن. و تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الخصائص المضادة للأوكسدة والمضادة للإلتهابات لمستخلصات هذه النبتة. تم تحضير مختلف المستخلصات باستخدام مذيبات متزايدة القطبية. وقد أظهرت نتائج تقدير كل من عديدات الفينول الكلية والفلافونويدات أن مستخلص إيثيل الأسيتات (EaE) هو الأغنى، حيث أن محتواه من عديدات الفينول بلغ 0.79 ± 525.79 مغ مكافئ حمض الغاليك/غ من المستخلص، و الذي يمثل ضعف ما يحتويه كل من المستخلص الخام (CE) ومستخلص الكلوروفورم (ChE)، أما كمية الفلافونويدات فقد بلغت 8.62 ± 194.19 مغ مكافئ quercetin/غ من المستخلص، و هي أكبر مما يحتويه كلا من مستخلصي ChE و CE بـ 5 مرات و 15 مرة على التوالي. كشفت نتائج اختبار النشاط المضاد للأوكسدة *in-vitro* أن جميع المستخلصات كانت فعالة في كل من تثبيط الإنزيم المؤكسد للكزاثين وإزاحة جذر فوق الأوكسيد الناتج عن هذا الإنزيم وذلك حسب الترتيب التالي: $CE < EaE < ChE$. في حين تبين باستخدام كلا من اختبار إزاحة جذر DPPH و اختبار منع تحلل كريات الدم الحمراء الناجم عن AAPH و اختبار FRAP، أن EaE يمتلك أعلى تأثير إزاحي للجذور الحرة ($0.03 \pm 5.3 = IC_{50}$ ميكروغرام/مل)، و أعلى نشاط مضاد لتحلل كريات الدم الحمراء ($2.99 \pm 131.66 = HT_{50}$ دقيقة)، بالإضافة إلى أكبر قوة إرجاعية ($4 EC_1 = 0.001 \pm 0.009$ غ/ل، $30 EC_1 = 0.002 \pm 0.005$ غ/ل). عند استخدام اختبار تبييض β -كاروتين، أظهر كل من EaE و ChE تأثيرا جد فعال لكبح أكسدة حمض اللينولييك (0.33 ± 84.36 % و 0.51 ± 82.60 % على التوالي). و على عكس ذلك، وباستعمال اختبار استخلاص أيون الحديد (Fe^{2+}) أظهر CE قدرة استخلاصية ممتازة ($0.001 \pm 0.332 = IC_{50}$ مغ/مل). تم تحريض التهاب القولون التجريبي عند الفئران باستعمال حمض الأسيتيك. وقد بينت النتائج أن معاملة الفئران بالمستخلص الميثانولي لـ *Paronychia argentea* (PAME) سبب انخفاضا معتبرا في مؤشر نشاط المرضى و وزن القولون و درجة المرض الظاهرة فيه و تركيز بروتين CRP في مصل الدم و معدل ترسيب كريات الدم الحمراء (ESR) و تركيز مركب MDA في القولون. كما أدت هذه المعاملة إلى زيادة كبيرة في طول القولون و صيغة تعداد الدم (FNS) و معدل الغلوتاثيون المختزل (GSH) و نشاط كل من إنزيمي SOD و CAT في القولون. أما بالنسبة لدراسة المقاطع النسيجية للقولون فقد أدت المعاملة إلى ظهور تقليص ملحوظا لضرر الأمعاء وتسرب الخلايا الليمفاوية لدى الفئران المعاملة، مما يدل على أن هذه النبتة أدت إلى كبح التهاب القولون الناجم عن حمض الأسيتيك. و بناء على هذه النتائج، يمكن لنبتة *Paronychia argentea* أن تستعمل كعلاج طبيعي مضاد للأوكسدة و مضاد لالتهاب القولون التقرحي.

الكلمات المفتاحية: *Paronychia argentea* L.، عديدات الفينول، النشاط المضاد للأوكسدة،

النشاط المضاد للإلتهاب، إلتهاب القولون التقرحي.

RESUME

Paronychia argentea, connue sous le nom: Bssat El-moulouk ou Kessaret Lahdjar, est utilisée dans la médecine traditionnelle en Algérie pour le traitement des ulcères gastriques et les maladies abdominales. La présente étude vise à évaluer les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits de cette plante. Les différents extraits ont été préparés par l'utilisation de solvants à polarités croissantes. Les dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle (EAc) représente la fraction la plus riche en polyphénols et en flavonoïdes, avec une teneur en polyphénols (525.79 ± 0.79 mg EAG/g E) double de celles de l'extrait brut (EBr) et l'extrait chloroformique (ECh), et une teneur en flavonoïdes (194.19 ± 8.62 mg EQ/g E) 5 et 15 fois supérieur à celles trouvées dans l'ECh et l'EBr, respectivement. Les résultats de l'activité antioxydante, évaluée par plusieurs tests *in-vitro*, ont révélé que tous les extraits étaient efficaces à la fois dans l'inhibition de la xanthine oxydase et le piégeage de l'anion superoxyde produit par cette enzyme dans l'ordre suivant: ECh > EAc > EBr. En utilisant les tests de DPPH, d'hémolyse induite par l'AAPH et du FRAP, l'EAc semble avoir respectivement l'effet anti-radicalaire ($IC_{50} = 5.3 \pm 0.03$ μ g/mL), l'activité anti-hémolytique ($HT_{50} = 131.66 \pm 2.99$ min) et le pouvoir réducteur (EC_1 à 4 min = 0.009 ± 0.001 g/L, EC_1 à 30 min = 0.005 ± 0.002 g/L) les plus puissants. Dans le test de blanchissement du β -carotène, l'EAc et l'ECh ont présenté un excellent effet inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique (84.36 ± 0.33 % et 82.60 ± 0.51 %, respectivement). Inversement, dans le test de chélation du fer ferreux, l'EBr a montré une excellente activité chélatrice ($IC_{50} = 0.332 \pm 0.001$ mg/mL). La colite expérimentale chez les souris a été induite par l'acide acétique. Les résultats ont révélé que le traitement des souris par l'extrait méthanolique de *Paronychia argentea* (EMPA) a montré une diminution très significative de l'indice d'activité de la maladie, du poids du côlon, du score d'activité macroscopique, de la protéine C-réactive (CRP), de la vitesse de sédimentation des érythrocytes (VS) et des concentrations coliques en malondialdéhyde (MDA). Ce traitement a également conduit à une augmentation très importante de la longueur du côlon, de la numération formule sanguine (FNS), des taux coliques en glutathion réduit (GSH) et de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT). Les coupes histologiques du côlon ont révélé une atténuation des dommages intestinaux et de l'infiltration des lymphocytes dans les souris traitées par l'EMPA, ce qui indique que cette plante a inhibé l'inflammation du côlon induite par l'acide acétique. En conclusion, *Paronychia argentea* peut servir comme un traitement naturel antioxydant et anti-inflammatoire pour la colite ulcéreuse.

Mots clés: *Paronychia argentea* L., polyphénols, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, colite ulcéreuse.

ABSTRACT

Paronychia argentea, known as: Bssat El-moulouk or Kessaret Lahdjar, is used in the Algerian traditional medicine for the treatment of gastric ulcers and abdominal diseases. The present study is designed to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory properties of this plant extracts. The different extracts were prepared using solvents of increasing polarity. The determination of total polyphenols and flavonoids contents have shown that the ethyl acetate extract (EaE) is the most rich fraction, with a polyphenols content of 525.79 ± 0.79 mg EAG/g E, double than those of the crude extract (CE) and the chloroform extract (ChE), and a flavonoids content of 194.19 ± 8.62 mg EQ/g E, 5 and 15 times higher than those found in ChE and CE, respectively. Results of the antioxidant activity assessed by several *in-vitro* tests, revealed that all the extracts were effective in both xanthine oxidase inhibition and scavenging of superoxide anion radical produced by this enzyme in the following order: ChE > EaE > CE. Using DPPH, AAPH-induced hemolysis and FRAP tests, the EaE seems to have the highest anti-radical effect ($IC_{50} = 5.3 \pm 0.03$ μ g/mL), the highest anti-hemolytic activity ($HT_{50} = 131.66 \pm 2.99$ min) and the most potent reducing power (EC_1 at 4 min = 0.009 ± 0.001 g/L, EC_1 at 30 min = $0.005 \pm 0,002$ g/L). In the β -carotene bleaching assay, EaE and ChE exhibited an excellent inhibitory effect on linoleic acid oxidation (84.36 ± 0.33 % and 82.60 ± 0.51 %, respectively). Inversely, in the ferrous iron chelating assay, the CE showed the excellent chelating activity ($IC_{50} = 0.332 \pm 0.001$ mg/mL). Experimental colitis in mice was induced by acetic acid. Treatment of mice with *Paronychia argentea* methanolic extract (PAME) showed a very significant decrease in the disease activity index, colon weight, macroscopic activity score, C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR) and the colonic Malondialdehyde (MDA) concentrations. This treatment caused also a very important increase of colon length, full blood count (FBC), colonic reduced glutathione (GSH) concentrations and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities. Histological sections of the colon revealed an attenuation of the intestinal damage and the infiltration of lymphocytes in mice treated with PAME, indicating that this plant inhibited the colonic inflammation induced by acetic acid. In conclusion, *Paronychia argentea* may serve as a natural antioxidant and anti-inflammatory treatment for ulcerative colitis.

Key words: *Paronychia argentea* L., polyphenols, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, ulcerative colitis.

LISTE DES ABREVIATIONS

5-ASA	Acide 5-Amino Salicylique
AAPH	2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
BHT	Butylated hydroxytoluene
CAT	Catalase
COX	Cyclo-oxygénase
cyt c	Cytochrome c
DPPH	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
EAc	Extrait d'acétate d'éthyle
EAG	Equivalents d'acide gallique
Eaq	Extrait aqueux
EBr	Extrait brut
ECh	Extrait de chloroforme
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EHx	Extrait d'héxane
EMPA	extrait méthanolique de <i>Paronychia argentea</i>
EQ	Equivalents de quercétine
ER	Equivalents de rutine
ERA	Espèces Réactives de l'Azote
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GC	Glucocorticoïdes
GPx	Glutathion peroxydase
GR	Glutathion Réductase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion disulfure oxydé
HOCl	Acide hypochloreux
HT₅₀	Half-hemolysis time
IC₅₀	Concentration inhibitrice de 50 %
LPO	Lipooxygénase
MDA	Malondialdéhyde
MPO	Myéloperoxydase
PFR	Protein to flavine ratio
SASP	Sulfasalazine

SD	Standard deviation
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamid gel electrophoresis
SEM	Standard error of the mean
SOD	Superoxyde dismutase
TBA	Thiobarbituric acid
TCA	Trichloroacetic acid
XDH	Xanthine déshydrogénase
XO	Xanthine oxydase
XOR	Xanthine oxydoréductase

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les principales ERO et ERA cellulaires ainsi que leurs inter-relations biochimiques.. Error! Bookmark not defined.	
Figure 2: Les principaux sites de production des espèces réactives d'oxygène et d'azote dans l'hémocyte.....	11
Figure 3: Effet de la radiation ionisante sur l'ADN, et formation des espèces radicalaires et non radicalaires issues de la radiolyse de l'eau.....	12
Figure 4: Les réactions catalysées par la XOR..	19
Figure 5: Mécanisme de génération des ERO par la XOR et activation des neutrophiles dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion.....	21
Figure 6: Les événements majeurs dans la réponse inflammatoire aiguë	23
Figure 7: Les résultats de l'inflammation aiguë: résolution, guérison et cicatrisation par fibrose ou inflammation chronique.	24
Figure 8: Structures des acides phénoliques	32
Figure 9: Structure générale des flavonoïdes.	33
Figure 10: Structures des différentes classes des flavonoïdes.....	34
Figure 11: Structure d'un exemple de tanins: le hamaméltanin.....	35
Figure 12: La formation du radical flavinique par l'effet scavenger des polyphénols sur les radicaux libres. Réaction de Fenton.....	36
Figure 13: Photos de <i>Paronychia argentea</i> prises en période de floraison.....	43
Figure 14: Etapes de l'extraction des polyphénols de <i>P. argentea</i>	46
Figure 15: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.	47
Figure 16: Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine	48
Figure 17: Courbes d'étalonnage de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 4 min et à 30 min	56
Figure 18: Courbe d'étalonnage du MDA.....	64
Figure 19: Courbe d'étalonnage du GSH.....	65
Figure 20: Spectre d'absorption UV-Vis et électrophorèse (SDS-PAGE) de la XO purifiée.....	72
Figure 21: Effet inhibiteur des extraits de <i>P. argentea</i> sur l'activité de la XO.....	74
Figure 22: Les concentrations des extraits de <i>P. argentea</i> et de l'allopurinol qui inhibent 50% de l'activité de la XO.....	74
Figure 23: Effet inhibiteur de la réduction du cyt c par l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ produit par la XO des extraits de <i>P. argentea</i>	76

Figure 24: Les concentrations des extraits de <i>P. argentea</i> qui inhibent la réduction de 50% du cyt c par le superoxyde produit par la XO	77
Figure 25: Les concentrations des extraits de <i>P. argentea</i> qui inhibent 50% de l'activité de la XO en comparaison avec celles qui inhibent la réduction de 50% du cyt c par l'O ₂ ^{•-} produit par cette enzyme.....	78
Figure 26: La réduction du DPPH par un antioxydant.....	79
Figure 27: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en présence de différentes concentrations des extraits de <i>P. argentea</i> (effet scavenger).....	79
Figure 28: Les concentrations des extraits de <i>P. argentea</i> et des standards qui inhibent 50% du radical DPPH (effet scavenger).....	80
Figure 29: Activité antioxydante des extraits de <i>P. argentea</i> , des antioxydants standards et des blancs par le test de β-carotène / acide linoléique pendant 48 heures	82
Figure 30: Activité antioxydante (à 24 h) des extraits de <i>P. argentea</i> , des antioxydants standards et des blancs par le test de β-carotène / acide linoléique.....	83
Figure 31: Cinétique de la réduction du Fe ³⁺ -TPTZ en Fe ²⁺ -TPTZ par les extraits de <i>P. argentea</i> à 4 min et à 30 min.....	84
Figure 32: Les valeurs de EC ₁ à 4 min et à 30 min des extraits de <i>P. argentea</i> et des antioxydants standards.....	85
Figure 33: Pourcentage d'inhibition de la formation du complexe ferrozine-Fe ²⁺ en présence de différentes concentrations des extraits de <i>P. argentea</i> (effet chélateur).....	87
Figure 34: Les concentrations des extraits de <i>P. argentea</i> et des standards qui inhibent 50% de la formation du complexe ferrozine-Fe ²⁺	88
Figure 35: Pourcentage d'hémolyse des érythrocytes induite par l'AAPH en présence des extraits de <i>P. argentea</i> et de la vitamine C (activité anti-hémolytique) pendant 270 minutes	90
Figure 36: Le temps de demi-hémolyse des extraits de <i>P. argentea</i> et de la vitamine C.....	91
Figure 37: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de <i>P. argentea</i> (EMPA) et de la sulfasalazine (SASP) sur le taux de survie des souris atteints de la colite par rapport aux groupes témoins normal et malade	92
Figure 38: Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur l'indice d'activité de la maladie des souris atteints de la colite par rapport aux groupes témoins normal et malade.....	96
Figure 39: Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur la longueur et le poids du côlon des souris atteints de la colite par rapport aux groupes témoins normal et malade.....	97
Figure 40: Images représentatives des côlons des sept groupes de souris après induction de la colite	98
Figure 41: Aspects macroscopiques des muqueuses coliques des sept groupes de souris après induction de la colite.....	99
Figure 42: Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur le score macroscopique chez les souris atteints de la colite par rapport aux groupes témoins normal et malade.....	100

- Figure 43:** Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur la VS dans la 1^{ère} et la 2^{ème} heure chez les souris atteints de la colite par rapport aux groupes témoins normal et malade ... 102
- Figure 44:** Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur les taux de CRP sérique chez les souris atteints de la colite par rapport aux groupes témoins normal et malade..... 103
- Figure 45:** Effets anti-péroxydation lipidique des différentes doses de l'EMPA et de la SASP en mesurant les taux de MDA colique chez les souris atteints de la colite par rapport aux groupes témoins normal et malade..... 107
- Figure 46:** Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur les taux de GSH colique chez les souris atteints de la colite par rapport aux groupes témoins normal et malade..... 108
- Figure 47:** Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur l'activité de la SOD colique chez les souris atteints de la colite par rapport aux groupes témoins normal et malade..... 110
- Figure 48:** Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur l'activité de la CAT colique chez les souris atteints de la colite par rapport aux groupes témoins normal et malade..... 112
- Figure 49:** Coupes histologiques des côlons des souris malades témoins et malades traitées par l'EMPA (50 mg/kg)..... 114
- Figure 50:** Coupes histologiques des côlons des souris normales témoins, malades traitées par la SASP et malades traitées par l'EMPA (100, 200, 500 mg/kg)..... 115

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: La formation mitochondriale des ERO	9
Tableau 2: Liste de quelques plantes médicinales utilisées en Algérie dans le traitement des maladies inflammatoires humaines.....	26
Tableau 3: Les rendements des extraits de <i>Paronychia argentea</i> et ses teneurs en polyphénols totaux et en flavonides	70
Tableau 4: Purification de la xanthine oxydoréductase (XOR) à partir du lait bovin frais.....	73
Tableau 5: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de <i>P. argentea</i> (EMPA) et de la sulfasalazine (SASP) sur le score de la perte du poids corporel chez les souris atteints de la colite	93
Tableau 6: Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur le score du sang dans les selles chez les souris atteints de la colite.....	94
Tableau 7: Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur le score de la consistance des selles chez les souris atteints de la colite	95
Tableau 8: Effets des différentes doses de l'EMPA et de la SASP sur les valeurs de FNS chez les souris atteints de la colite.....	105

SOMMAIRE

INTRODUCTIONERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le stress oxydatif	4
1.1. Définition.....	4
1.2. Les radicaux libres et les espèces réactives.....	4
1.3. Sources des radicaux libres	8
1.4. Rôles physiologiques des radicaux libres.....	14
1.5. Cibles des radicaux libres.....	15
1.6. Stress oxydatif et maladies	17
2. La xanthine oxydoréductase	18
2.1. Structure, mécanisme d'action et distribution.....	18
2.2. Rôle physiologique.....	19
2.3. Rôle pathologique.....	20
2.4. Les inhibiteurs de l'enzyme	21
3. L'inflammation	22
3.1. Définition et mécanisme.....	22
3.2. Pathologies inflammatoires	24
3.3. Les anti-inflammatoires.....	24
4. Les systèmes de défense antioxydants.....	27
4.1. Les antioxydants enzymatiques.....	27
4.2. Les antioxydants non-enzymatiques	29
5. Les polyphénols.....	31
5.1. Classes principales des polyphénols.....	31
5.2. Activités biologiques des polyphénols	35
6. Présentation de la plante étudiée: <i>Paronychia argentea</i>	39
6.1. Description et caractérisation	39
6.2. Dénomination et taxonomie	40
6.3. Propriétés biologiques et toxicité	41
6.4. Composition chimique	42

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique.....	43
2. Méthodes.....	44
2.1. Extraction des polyphénols de <i>Paronychia argentea</i>	44

2.2. Dosage des polyphénols totaux.....	47
2.3. Dosage des flavonoïdes.....	47
2.4. Purification de la xanthine oxydase (XO)	48
2.5. L'activité antioxydante de <i>P. argentea</i> en utilisant des tests <i>in-vitro</i>	51
2.5.1. Effet inhibiteur de l'activité de la XO	51
2.5.2. Effet scavenger sur le radical superoxyde produit par la XO.....	52
2.5.3. Activité anti-radicalaire (scavenger) sur le radical DPPH	53
2.5.4. Test de β -carotène/acide linoléique.....	53
2.5.5. Evaluation du pouvoir réducteur par la technique de FRAP.....	54
2.5.6. Chélation des ions ferreux	56
2.5.7. Activité anti-hémolytique <i>in-vitro</i> en utilisant l'AAPH.....	57
2.6. L'activité anti-inflammatoire de <i>P. argentea</i>	58
2.6.1. Induction de la colite expérimentale par l'acide acétique chez les souris.....	58
2.6.2. Traitement des animaux	59
2.6.3. Sacrifice des animaux, prélèvement des échantillons et préparation des homogénats tissulaires.....	59
2.6.4. Observations générales et score clinique.....	60
2.6.5. Score macroscopique.....	61
2.6.6. Les marqueurs de l'inflammation (VS, CRP, FNS).....	62
2.6.7. Les paramètres antioxydants (MDA, GSH, SOD, CAT)	63
2.6.8. Analyse histologique du côlon	67
2.7. Analyse statistique.....	68

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Extraction des composés phénoliques de <i>P. argentea</i> et dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	69
2. Purification de la xanthine oxydase	71
3. L'activité antioxydante <i>in-vitro</i>	73
3.1. Effet inhibiteur de l'activité de la XO	73
3.2. Effet scavenger sur le radical superoxyde produit par la XO	76
3.3. Activité anti-radicalaire (scavenger) sur le radical DPPH.....	78
3.4. Test de β -carotène/acide linoléique	81
3.5. Evaluation du pouvoir réducteur par la technique de FRAP	83
3.6. Chélation des ions ferreux	86
3.7. Activité anti-hémolytique <i>in-vitro</i> en utilisant l'AAPH	89
4. L'activité anti-inflammatoire de <i>P. argentea</i>	91
4.1. Observations générales et score clinique	91
4.2. Score macroscopique	96

4.3.	Effet sur les marqueurs de l'inflammation dans le sang.....	101
4.3.1.	Effet sur les valeurs de VS et CRP.....	101
4.3.2.	Effet sur les valeurs de FNS.....	104
4.4.	Effet sur les paramètres antioxydants dans le côlon.....	106
4.4.1.	Effet sur les taux de MDA.....	106
4.4.2.	Effet sur les taux de GSH.....	108
4.4.3.	Effet sur l'activité de la SOD.....	109
4.4.4.	Effet sur l'activité de la CAT.....	111
4.8.	Analyse histologique du côlon.....	112
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		121

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le stress oxydatif se produit lorsque l'équilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et la quantité des antioxydants est interrompu. Ceci peut conduire à des dommages des biomolécules telles que les protéines, les lipides et les acides nucléiques, et conduit finalement à la mort cellulaire provoquant des troubles physiologiques tels que le cancer, le diabète, l'asthme, le vieillissement prématuré et les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et inflammatoires (Subedi *et al.*, 2014).

D'autre part, l'inflammation est un élément central de nombreuses conditions physiopathologiques comme une réponse aux lésions tissulaires et une défense de l'hôte contre les agressions exogènes. Les cellules pro-inflammatoires, principalement les macrophages activés, assurent la médiation de la plupart des physiopathologies inflammatoires cellulaires et moléculaires en produisant des cytokines et d'autres molécules pro-inflammatoires, comme les prostaglandines et les radicaux libres tels que l'oxyde nitrique. Ces molécules sont impliquées dans la pathogenèse de nombreuses maladies chroniques, comme la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et le cancer du côlon (Cuong *et al.*, 2015).

Par conséquent, les radicaux libres sont des médiateurs très importants qui provoquent ou maintiennent les processus inflammatoires. Leur neutralisation par les antioxydants peut de ce fait atténuer l'inflammation (Jiménez *et al.*, 2015). En outre, il a été montré que certains composés anti-inflammatoires ont un effet antioxydant ou un mécanisme de piégeage des radicaux libres (Chang *et al.*, 2011).

Une grande partie de la population dans le monde utilise la médecine traditionnelle basée principalement sur les plantes médicinales, qui jouent un rôle très important dans la protection

de l'organisme (Jiménez *et al.*, 2015). Plusieurs médicaments sont dérivés des plantes ou des molécules d'origine végétale (Shakeri et Boskabady, 2015). Les plantes sont aujourd'hui reconnues comme une source riche en composés antioxydants comme les composés phénoliques, les anthocyanines et les flavonoïdes. Ces composés sont principalement utilisés dans l'industrie agroalimentaire. Il est actuellement admis que la consommation des antioxydants à base de plantes médicinales peut réduire le risque d'apparition de plusieurs maladies humaines liées au stress oxydatif (Tauchen *et al.*, 2015).

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les activités antioxydantes et anti-inflammatoires, et de déterminer le contenu en polyphénols et en flavonoïdes de *Paronychia argentea*. Cette plante est traditionnellement utilisée pour traiter ou prévenir plusieurs maladies comme l'urolithiase, les maladies rénales, le diabète, les ulcères gastriques, l'anorexie, les flatulences, les maladies abdominales, les maladies de la vessie et de la prostate, ainsi que les douleurs cardiaques. Cette plante est également utilisée comme analgésique gastrique (Boudjelal *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2013; Sait *et al.*, 2015). Malgré son utilisation dans les systèmes traditionnels, les études pour expliquer les effets pharmacologiques de cette plante restent très limitées.

Pour évaluer l'activité antioxydante des différents extraits de *P. argentea*, de nombreuses méthodes *in-vitro* ont été réalisées, telles que : (i) détermination de l'activité inhibitrice de la xanthine oxydase productrice d'espèces réactives de l'oxygène, (ii) détermination de l'activité anti-radicalaire (test de piégeage de $O_2^{\cdot-}$ produit par la xanthine oxydase et test de DPPH), (iii) détermination de l'activité anti-péroxydation lipidique (test de β -carotène-acide linoléique), (iv) évaluation du pouvoir réducteur par la méthode de FRAP, (v) évaluation de l'activité chélatante par le test de ferrozine et (vi) évaluation de l'activité anti-hémolytique *in-vitro* en utilisant le test d'AAPH.

Pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de *P. argentea*, un modèle d'inflammation aiguë a été choisi: la colite expérimentale induite par l'acide acétique chez les souris. Les paramètres antioxydants *in-vivo* ont été déterminés par le dosage de MDA, GSH, SOD et CAT.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE STRESS OXYDATIF

1.1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif a été défini comme le déséquilibre entre la présence d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERO et ERA) et la capacité de l'organisme à neutraliser leur action par les systèmes de protection antioxydants (Persson *et al.*, 2014; Moniczewski *et al.*, 2015). Le déséquilibre entre les espèces oxydantes (ERO / ERA) et le système de défense antioxydant peut déclencher des facteurs spécifiques responsables des dommages oxydatifs au niveau des acides nucléiques, des lipides et des protéines cellulaires, et donc l'apparition des maladies. (Pisoschi et Pop, 2015; Smaga *et al.*, 2015).

1.2. Les radicaux libres et les espèces réactives

Les radicaux libres représentent des espèces chimiques réactives possédant un électron non apparié sur l'orbite externe (Poljsak *et al.*, 2013). Les ERO sont représentées soit par des radicaux oxygénés comme le radical hydroxyle (OH^\bullet) et l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), ou par des dérivés de l'oxygène non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), qui sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux libres (Favier, 2003). L'oxygène moléculaire est progressivement réduit à une série d'espèces intermédiaires: le radical hydroperoxyde (HO_2^\bullet), le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le groupement hydroxyle (OH^-) et le radical hydroxyle (OH^\bullet) (**Figure 1**). La réduction progressive de l'oxygène moléculaire se déroule comme suit (Pisoschi et Pop, 2015):

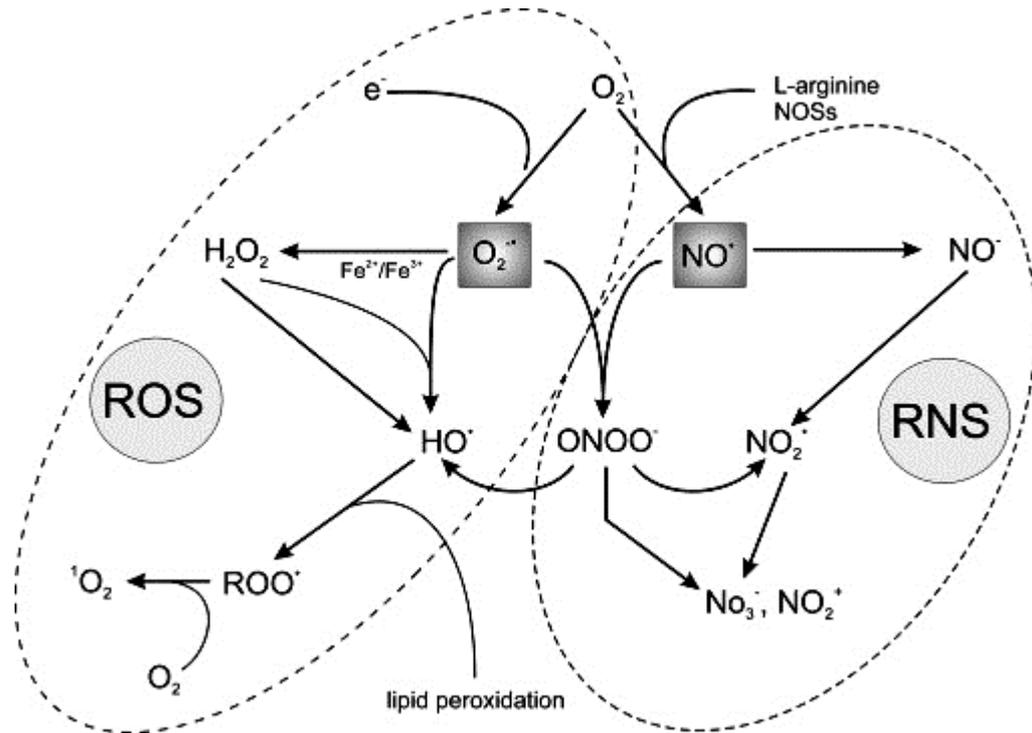
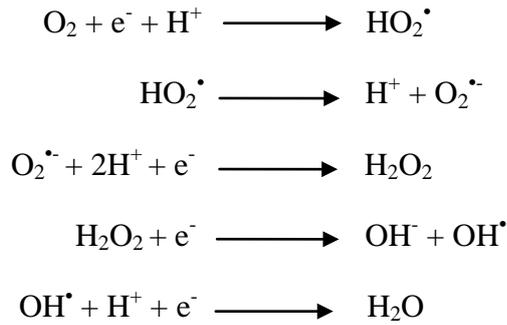
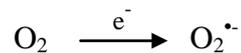


Figure 1: Les principales ERO et ERA cellulaires ainsi que leurs inter-relations biochimiques. D'après Moniczewski *et al.* (2015).

- **Le radical superoxyde (O_2^\bullet):** Dans la respiration cellulaire, le processus de réduction des molécules d'oxygène par un seul électron est la principale source endogène de O_2^\bullet (Moniczewski *et al.*, 2015).



Le superoxyde résulte d'une réduction de l'oxygène par diverses oxydases, tels que la dihydro nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPHO), la xanthine oxydase (XO) et la cyclo-oxygénase. Les radicaux superoxydes peuvent également être

formés dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, au cours de la phosphorylation oxydative qui produit l'ATP (Evans *et al.*, 2005; Drose et Brandt, 2012). Le radical résultant est un précurseur à d'autres ERO, y compris le radical hydroxyle (OH[•]) (Repetto *et al.*, 2012).



L'anion superoxyde peut être dismuté, produisant l'oxygène moléculaire et le peroxyde d'hydrogène (Kohen et Nyska, 2002).

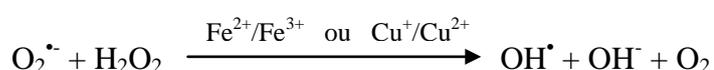


Le radical superoxyde peut être transformé par des enzymes appartenant à la famille de la superoxyde dismutase (SOD), qui détruisent les radicaux superoxydes dans la chaîne de transport d'électrons (Miao et Clair, 2009; Gandhi et Abramov, 2012).

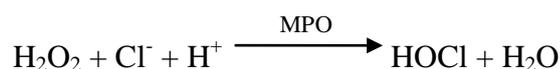
- **Le radical hydroperoxyde (HO₂[•]):** C'est une forme protonée de l'anion superoxyde (De Grey, 2002). Le radical hydroperoxyde est à la fois un oxydant et un réducteur plus fort que l'anion superoxyde, mais il est beaucoup moins stable que l'anion superoxyde à pH 7.4. A cette valeur de pH physiologique, le HO₂[•] se dissocie donnant le radical superoxyde (Pisoschi et Pop, 2015).

- **Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂):** Le peroxyde d'hydrogène est un oxydant très fort de deux électrons, mais à cause de l'énergie d'activation élevée, la plupart de ses réactions d'oxydation à deux électrons sont trop lentes pour être biologiquement pertinentes (Winterbourn, 2013). Le peroxyde d'hydrogène n'oxyde pas directement les molécules sensibles aux oxydants dans l'usage courant. Il est beaucoup plus réactif avec les métaux de transition, soit sous la forme de complexes de faible poids moléculaire ou des métalloprotéines. Les complexes métalliques résultants peuvent réagir avec une large gamme de substrats, y compris les molécules sensibles aux oxydants, pour générer des radicaux libres (Winterbourn, 2014).

- **Le radical hydroxyle (OH[•]):** C'est une espèce radicalaire très agressive, responsable de la plupart des dommages oxydatifs des biomolécules. Il a été rapporté comme le radical oxydant le plus puissant qui peut interagir au niveau du site de sa génération avec la plupart des molécules (ADN, protéines, lipides, acides aminés et sucres) (Pisoschi et Pop, 2015). La présence d'ions métalliques catalyse la voie connue comme la réaction de Fenton. Dans ce procédé, le substrat, qui est le peroxyde d'hydrogène, génère le radical hydroxyle (Moniczewski *et al.*, 2015).



- **L'acide hypochloreux (HOCl):** L'acide hypochloreux ressort grâce à la présence de la myéloperoxydase (MPO) dans les macrophages et les neutrophiles. Il est doté d'une capacité oxydante très élevée (Winterbourn, 2014; Pisoschi et Pop, 2015). La myéloperoxydase est responsable de la production catalytique de l'acide hypochloreux à partir du peroxyde d'hydrogène en présence de l'anion chlorure (Cl⁻). Le HOCl provoque la chloration oxydative sur les biomolécules telles que les lipides, les protéoglycanes, les acides aminés, ainsi que d'autres composés intracellulaires ou membranaires (Pisoschi et Pop, 2015).



- **Les radicaux peroxydes:** Le processus de la chaîne de peroxydation lipidique est un générateur des groupes des radicaux: peroxydes (ROO[•]), hydrocarbures (R[•]), lipidiques (L[•]) et peroxydes lipidiques (LOO[•]). La plupart d'entre eux sont capables d'induire un état singulet de la molécule d'oxygène (¹O₂) (Moniczewski *et al.*, 2015). Cordeiro, (2014) a démontré, que cette forme de l'oxygène pénètre facilement la bicouche phospholipidique des membranes cellulaires et peut déclencher d'autres chaînes de peroxydation.

- **Monoxyde d'azote (NO), peroxydinitrite (ONOO[•]) et dioxyde de nitrogène (NO₂[•]):**

L'oxyde nitrique endogène (monoxyde d'azote: NO) est synthétisé à partir de la L-arginine, de l'oxygène et du NADPH, par la NO synthase (NOS) ou par réduction du nitrate inorganique. Il est également libéré par les phagocytes (monocytes, macrophages et neutrophiles) en tant que résultat de la réaction du système immunitaire (Pisoschi et Pop, 2015). Il réagit avec l'anion superoxyde, donnant une espèce d'azote très réactive (peroxydinitrite: ONOO[•]), qui est un puissant oxydant de nombreuses molécules biologiques (Pisoschi et Pop, 2015; Moniczewski *et al.*, 2015). Le peroxydinitrite peut par la suite être décomposé en radicale hydroxyle et dioxyde de nitrogène (NO₂[•]) (Winterbourn, 2014; Moniczewski *et al.*, 2015).

1.3. Sources des radicaux libres

Les radicaux libres sont générés dans les processus aérobiques comme la respiration cellulaire, l'exposition aux infections microbiennes impliquant l'activation des phagocytes, pendant l'activité physique intensive ou l'action des polluants et toxines telles que la fumée de cigarette, l'alcool, ionisation et radiations UV, les pesticides et l'ozone (Poljsak *et al.*, 2013).

1.3.1. Sources endogènes

- **La mitochondrie:** Dans les conditions physiologiques, la chaîne respiratoire mitochondriale est la source la plus significative des ERO dans les cellules des mammifères (**Figure 2**). Les ERO libérés par les mitochondries peuvent être balayés par les systèmes antioxydants cellulaires, ou causer des dommages oxydatifs des acides gras polyinsaturés dans les membranes biologiques, des protéines et des acides nucléiques (**Tableau 1**) (Venditti *et al.*, 2013).

Tableau 1: La formation mitochondriale des ERO (Moniczewski *et al.*, 2015).

Composant	Emplacement	ERO
Complexe II (Succinate déshydrogénase)	Surface interne de la membrane interne	O ₂ ^{•-}
Complexe I (NADH déshydrogénase)	Surface interne de la membrane interne	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂
Complexe III (complexe bc1, ubiquinone:cytochrome c réductase)	Surface interne de la membrane interne	O ₂ ^{•-}
Cytochrome b5	Membrane externe	O ₂ ^{•-}
Monoamine oxydases (MAO-A et MAO-B)	Membrane externe	H ₂ O ₂
Aconitase	Matrice mitochondriale	O ₂ ^{•-} , OH [•]
Complexe cétooglutarate déshydrogénase (2-oxoglutarate déshydrogénase)	Membrane interne du côté de la matrice	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂
Dihydroorotate déshydrogénase	Surface externe de la membrane interne	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂
Complexe pyruvate déshydrogénase	Matrice mitochondriale	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂
Complexe oxoglutarate déshydrogénase	Matrice mitochondriale	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂

- **Le réticulum endoplasmique:** Le réticulum endoplasmique (RE) est l'endroit où les protéines se replient et se rassemblent dans des complexes dans la voie de production des protéines, et c'est un site de production des ERO dans les cellules (**Figure 2**) (Donaghy *et al.*, 2015). Les systèmes enzymatiques réticulaires P450 représentent une source significative des ERO dans laquelle les électrons sont transférés du NADPH par l'intermédiaire de la NADPH-cytochrome P450 réductase (Manoj *et al.*, 2010).

- **Réponse des cellules phagocytaires aux inflammations et infections:** Les ERO et ERA sont générés par les phagocytes dans quatre réactions catalysées par quatre enzymes (**Figure 2**) (Block et Gorin, 2012). La réaction réalisée par la NADPH oxydase (NADPHO) phagocytaire est une réduction incomplète de l'O₂ pour produire l'anion superoxyde, qui est ensuite transformé en H₂O₂ par une réaction de dismutation.



La myéloperoxydase, une enzyme lysosomale pro-inflammatoire trouvée dans les leucocytes, catalyse la production d'acide hypochloreux, un agent oxydant et antimicrobien très puissant, qui réagit rapidement avec les cellules et entraîne leur mort (Lloyd *et al.*, 2013). L'HOCl est généré par l'action combinée du H₂O₂ (qui est dismuté par la SOD à partir du O₂^{•-} généré par la NADPHO) et la MPO (Kardeh *et al.*, 2014; Donaghy *et al.*, 2015). En plus de ces formes des ERO, les phagocytes activés sécrètent également le NO, formé lors de la conversion de l'arginine, catalysée par la eNOS (endothelial NOS) et iNOS (Ca²⁺-independent inducible NOS) dans l'endothélium vasculaire (El Assar *et al.*, 2013).

- **La lipoxygénase:** La transformation catalytique de l'acide arachidonique par les voies de la lipoxygénase conduit à la génération de OH[•] et O₂^{•-}, suivis par des peroxydes lipidiques (Nanda *et al.*, 2007). Les produits finaux de la peroxydation lipidique par ces ERO, le 4-hydroxynonéal et l'acroléine, exercent quelques effets biologiques et cytotoxiques, qui provoquent des endommagements aux cellules (Barrera, 2012).

- **Les peroxysomes:** Les principaux procédés métaboliques responsables de la production des ERO dans les peroxysomes comprennent: le métabolisme cellulaire des lipides par la β-oxydation d'acide gras, la réaction glycolate-oxydase et la réaction enzymatique de la XO et la iNOS (Fransen *et al.*, 2012). Les peroxysomes ont un rôle significatif à la fois dans la production et le piégeage (scavenging) des ERO dans la cellule, en particulier le H₂O₂ (Kardeh *et al.*, 2014). Ces organites contiennent diverses enzymes qui produisent le H₂O₂ et le O₂^{•-} en tant que partie de leur cycle catalytique normal (**Figure 2**) et jouent un rôle central dans le métabolisme cellulaire du H₂O₂. Il existe deux sources enzymatiques potentielles de O₂^{•-} et NO dans les peroxysomes (la XO et la iNOS) (Nordgren et Fransen, 2014).

- **La xanthine oxydase (XO):** Les ERO et ERA peuvent être synthétisées par une variété d'enzymes, y compris la xanthine oxydase. La XO qui est responsable du métabolisme des purines, en convertissant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Kundu *et*

al., 2012) avec réduction de l'oxygène moléculaire, est une source enzymatique de H_2O_2 et de $O_2^{\cdot-}$ (Terpolilli *et al.*, 2012; Kardeh *et al.*, 2014). La XO catalyse aussi la réduction du nitrate en nitrite et NO (Terpolilli *et al.*, 2012). Elle est également une source significative des ERO dans les maladies inflammatoires (Kelley *et al.*, 2010).

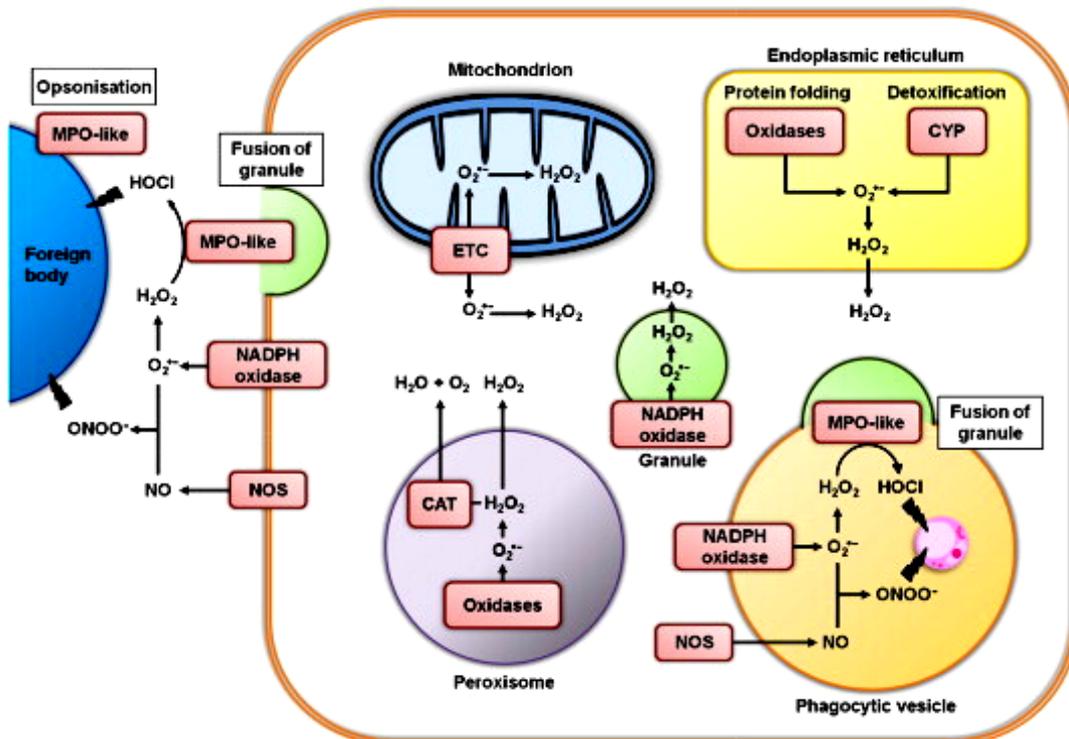


Figure 2: Les principaux sites de production des espèces réactives d'oxygène et d'azote dans l'hémocyte. Abréviations: CAT, catalase; CYP, cytochrome P-450; ETC, electron transfer chain; MPO, myeloperoxidase; NOS, nitric oxide synthase. D'après Donaghy *et al.* (2015).

1.3.2. Sources exogènes

- **Les radiations ionisantes:** Les radiations ionisantes peuvent endommager les molécules intracellulaires par ionisations induites par les produits de radiolyse de l'eau cellulaire (**Figure 3A**), avec environ deux tiers des dommages de l'ADN (Nias, 1998; Holley *et al.*, 2014). La radiolyse de l'eau conduit à la formation d'une variété de radicaux libres. Par exemple, l'eau est ionisée pour former un radical de l'eau et un électron libre. Le radical de l'eau peut soit subir une décomposition ou interagir avec une molécule d'eau pour former des

radicaux hydroxyles. L'électron libre peut être hydraté par des molécules d'eau, cet électron stabilisé peut interagir soit avec une autre molécule d'eau pour former un radical hydroxyle ou avec un le O_2 pour former un $O_2^{\cdot-}$ (**Figure 3B**) (McParland et Nuclear, 2010; Holley *et al.*, 2014).

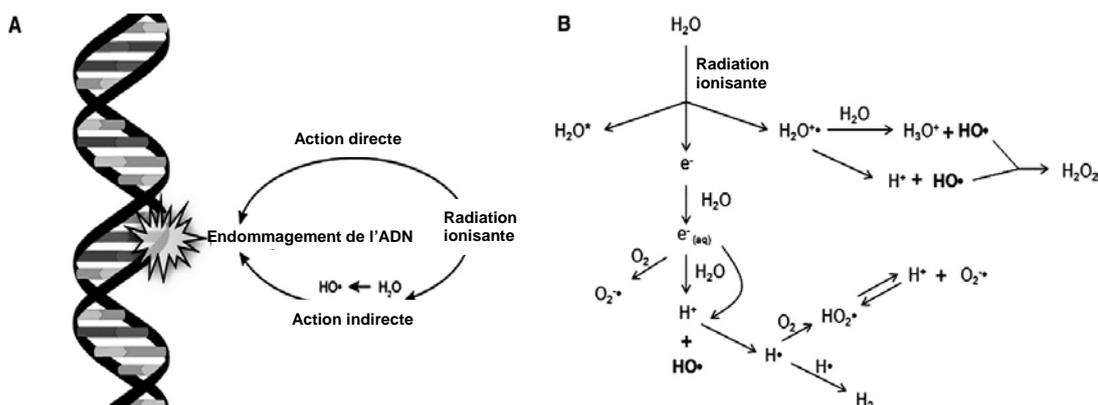


Figure 3: Effet de la radiation ionisante sur l'ADN (A), et formation des espèces radicalaires et non radicalaires issues de la radiolyse de l'eau (B). Adaptée de Holley *et al.* (2014).

- **La température:** La température élevée provoque l'accumulation des ERO dans la cellule. L'augmentation de la température à 42 °C a entraîné une diminution significative du potentiel membranaire mitochondriale et cytoplasmique, et une augmentation de la formation des ERO intracellulaires (Zhang *et al.*, 2015). Des corrélations positives ont été observées entre la température et les taux de peroxydation lipidique et de H_2O_2 à la fois (Paital et Chainy, 2014).

- **Les médicaments:** Plusieurs résultats *in-vitro* et *in-vivo* indiquent que la toxicité de divers médicaments chimiothérapeutiques implique une production accrue des ERO et du stress oxydatif (Aiassa *et al.*, 2015). D'autre part, les résultats *in-vivo* montrent que la Dexaméthasone augmente la capacité de production des ERO des cellules myéloïdes ainsi que dans les monocytes et macrophages (Kraaij *et al.*, 2011).

- **Les toxines:** L'interaction entre les toxines et les neutrophiles augmentent significativement la production des ERO et conduit à un stress oxydatif, suivi par la mort cellulaire par apoptose (Paraje *et al.*, 2005).

- **Le tabagisme et les minéraux:** La fumée de cigarette est une source importante des ERO qui provoquent la peroxydation des lipides, des dommages aux membranes cellulaires, aux protéines et à l'ADN. Le tabagisme chez la mère provoque une augmentation du stress oxydatif dans le sang du placenta qui passe au fœtus à travers le cordon ombilical (Aydogan *et al.*, 2013). Selon Stangenberg *et al.* (2015), les enfants des mères exposées à la fumée de cigarette ont une activité antioxydante mitochondrial réduite ainsi que des changements des structures mitochondriales avec des taux très élevés en ERO, ce qui provoque un endommagement de l'ADN avec une augmentation du stress oxydatif.

Les expositions chroniques aux métaux lourds par l'exposition professionnelle et le tabagisme peuvent augmenter le risque du cancer de la tête et du cou. Le chrome trivalent et hexavalent (CrIII et CrVI) sont présents dans la nature. Au cours de la réduction du CrVI en CrIII, de nombreuses espèces réactives sont formées, et causent des dommages de l'ADN. Le CrV et CrIV réagissent avec le H₂O₂ pour générer ainsi le radical hydroxyle par la réaction de Fenton (Khlifi et Hamza-Chaffai, 2010). D'autre part, Le cadmium affecte la stabilité du génome par induction des ERO dans les cellules, mais également par la réduction de l'activité des antioxydants comme le glutathion cellulaire (McMurray et Tainer, 2003). L'inhalation de la poussière de minéraux (la silice, l'amiante, ou le charbon) provoque la sécrétion très élevée des ERO (O₂^{•-}, OH[•] et H₂O₂), ce qui contribue à la perturbation de la fonction immunitaire cellulaire, l'inflammation et le cancer du poumon (Muzembo *et al.*, 2015).

1.4. Rôles physiologiques des radicaux libres

Les espèces réactives de l'oxygène présentent un paradoxe dans leurs fonctions biologiques: d'une part, ils préviennent les maladies en aidant le système immunitaire, par la médiation de la signalisation cellulaire et en jouant un rôle essentiel dans l'apoptose. D'autre part, ils peuvent endommager les macromolécules importantes dans les cellules (Seifried *et al.*, 2007).

1.4.1. Défense contre les infections

Lorsque les phagocytes sont activés, ils produisent des ERO en quantités suffisantes pour tuer les bactéries (Nordberg et Arnér, 2001; Seifried *et al.*, 2007). Dans ce système, les ERO sont produits par le complexe NADPHO qui transforme le O_2 en $O_2^{\bullet-}$ (Kardeh *et al.*, 2014). Le $O_2^{\bullet-}$ est ensuite réduit dans le phagosome par la SOD en H_2O_2 qui peut être par la suite converti en HOCl par la MPO (Lloyd *et al.*, 2013). Le HOCl peut alors former spontanément le OH^{\bullet} . Ces deux molécules hautement réactives sont très toxiques pour les bactéries ingérées par les phagocytes et portent les effets antimicrobiens directs des ERO. Le HOCl est également un élément important de la défense antimicrobienne par destruction de l'ancrage de l'ADN à la membrane bactérienne, ce qui entraîne l'arrêt de la réplication de l'ADN des bactéries (Nordberg et Arnér, 2001).

1.4.2. Transduction du signal et régulation de la prolifération cellulaire

La production contrôlée des ERO est essentiel pour l'activité des voies de transduction du signal, et une large classe de molécules de transduction du signal sur lesquelles les ERO influencent leur fonction est les MAPK (mitogen-activated protein kinases) (Hurd *et al.*, 2012). Les MAPK sont composées de trois sous-familles: les ERK (extracellular signal-regulated kinases); les JNK (kinases *c-Jun* N-terminal); et les kinases p38 (Martindale et Holbrook, 2002; Droge, 2002). Les ERK coordonnent le signal grâce à des facteurs de

croissance tels que le EGF (epidermal growth factor). Le récepteur de l'EGF (EGFR) est activé par les ERO, semblable à son activation par la liaison de son ligand (EGF). L'activation de l'EGFR provoque l'autophosphorylation de ce récepteur, et l'activation des kinases MAPK (MAPKK), et donc l'activation des ERK. L'activation des ERK en réponse aux ERO favorise généralement la régulation de la prolifération cellulaire (Holbrook et Ikeyama, 2002; Li et Holbrook, 2003). Concernant les deux autres familles de MAPK (JNK et p38), dans des conditions normales d'oxydo-réduction la protéine thioredoxine (Trx) se lie à la ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) et l'inhibe. Le stress oxydatif provoque la dissociation du complexe Trx-ASK1, conduisant ainsi à l'activation des JNK et p38 par ASK1 (Martindale et Holbrook, 2002). L'activation de ces kinases (JNK et p38) implique de multiples MAPKK ainsi que l'interaction des protéines régulatrices de la prolifération conduisant à l'apoptose ou la nécrose (Kardeh *et al.*, 2014). Ces processus ont également des rôles positifs dans l'élimination des cellules transformées (suppression des tumeurs) (Seifried *et al.*, 2007).

1.5. Cibles des radicaux libres

Malgré que les ERO jouent un rôle positif dans les voies physiologiques normales et les fonctions nécessaires des cellules, leurs concentrations et leur surproduction élevées sont extrêmement toxiques pour la vie cellulaire en endommageant les macromolécules telles que les lipides, l'ADN et les protéines (Gandhi et Abramov, 2012; Kardeh *et al.*, 2014).

1.5.1. La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est le processus oxydatif de la dégradation des lipides par les ERO (Kardeh *et al.*, 2014). La réaction incontrôlée des ERO avec les lipides membranaires, en particulier les chaînes d'acides gras polyinsaturés, conduira à une génération innombrable de radicaux libres produits dans une réaction en chaîne, qui provoque la détérioration des membranes (Kardeh *et al.*, 2014; Pisoschi et Pop, 2015). Dans la phase d'initiation de la

réaction en chaîne de la peroxydation, une molécule d'ERO réagit avec une chaîne d'acide gras insaturé. Les produits de l'étape d'initiation sont un radical d'acide gras et une molécule d'eau (Kardeh *et al.*, 2014). Le radical d'acide gras n'est pas stable, dans la phase de propagation, il a tendance à réagir avec l'O₂ pour produire un radical peroxyde lipidique (lipide-proxyl). Cette molécule générée réagit ensuite avec un autre acide gras insaturé et produit un autre radical d'acide gras et un peroxyde lipidique. Le radical d'acide gras participe à un nouveau cycle de la même série de réactions et produit plus de radicaux libres et de peroxydes lipidiques (Raedschelders *et al.*, 2012; Kardeh *et al.*, 2014). L'attaque oxydative des lipides génère également des aldéhydes réactifs, tels que le malondialdéhyde et le 4-hydroxynonanal qui sont cancérigènes et mutagènes, car ils peuvent détériorer l'ADN. D'autre part, ils peuvent attacher à des protéines et peuvent donc affecter leurs fonctions (Raedschelders *et al.*, 2012; Kardeh *et al.*, 2014; Pisoschi et Pop, 2015).

1.5.2. Oxydation de l'ADN

Les ERO sont des dérivés toxiques du métabolisme aérobie et sont nocifs pour les cellules vivantes, entraînant des dommages de l'ADN, le vieillissement, ou la mort cellulaire (Saito *et al.*, 2015). Les molécules d'ADN sont susceptibles d'être endommagés par les ERO suite à une abstraction d'hydrogène initiale médiée par le OH[•], suivie par une modification des purines ou pyrimidines et/ou une fragmentation (Raedschelders *et al.*, 2012; Kardeh *et al.*, 2014). L'ADN cellulaire est une cible des dommages médiés par les ERO, et le 8-hydroxyl-2'-désoxyguanosine est un produit bien caractérisé des altérations de l'ADN qui se produit de l'oxydation du nucléoside guanosine par le OH[•] (Sugamura *et al.*, 2011; Pisoschi et Pop, 2015).

1.5.3. Oxydation des protéines

Dans les conditions du stress oxydatif, l'excès des ERO peut endommager les protéines, les lipides et l'ADN cellulaires conduisant à des dommages fatals à la cellule qui peuvent contribuer à la cancérogenèse (Kardeh *et al.*, 2014; Moniczewski *et al.*, 2015). Le dommage des protéines peut se produire par oxydation du thiol, une carbonylation, une fragmentation ou un mauvais repliement et déploiement, résultant dans la perte de l'activité de la protéine (Pisoschi et Pop, 2015). Tous les acides aminés sont sensibles à l'oxydation: les cystéines et méthionines sont facilement oxydables (Raedschelders *et al.*, 2012; Pisoschi et Pop, 2015). L'oxydation de la lysine, la proline, l'arginine et la thréonine donne également lieu à des marqueurs de dérivés carbonylés (Pisoschi et Pop, 2015). Les acides aminés aromatiques sont également susceptibles d'être oxydés par les différentes espèces oxygénées: l'oxydation de la tyrosine initiée par des radicaux OH^\bullet produit la dityrosine, la réaction avec des ERA forme la 3-nitrotyrosine, alors que la réaction avec le HOCl donne la 3-chlorotyrosine (Raedschelders *et al.*, 2012; Sung *et al.*, 2013). Les acides aminés sont soumis indirectement à une attaque par les aldéhydes réactifs tels que le MDA et le 4-hydroxynonéal qui sont des produits de la peroxydation lipidique induite par les ERO. La cytochrome oxydase est soumise à la modification et l'inhibition par le 4-hydroxynonéal (Raedschelders *et al.*, 2012). D'autre part, le dommage des membranes mitochondriales et des structures des protéines peut, à son tour, améliorer la production des ERO, conduisant à une altération de l'ADN et la mort cellulaire par apoptose (Pisoschi et Pop, 2015).

1.6. Stress oxydatif et maladies

Le déséquilibre entre les espèces oxydantes et le système de défense antioxydant peut déclencher des facteurs spécifiques responsables des dommages oxydatifs dans la cellule: la sur-expression des gènes oncogènes, génération des composés mutagènes, la prolifération incontrôlée des cellules et l'invasion tumorale. Cela conduit à la création et la progression du

cancer (Kardeh *et al.*, 2014; Pisoschi et Pop, 2015; Saito *et al.*, 2015). En plus, les ERO peuvent aggraver les lésions cérébrales (Bordt et Polster, 2014), ce qui conduit à une neurodégénérescence et des troubles neuropsychiatriques (Smaga *et al.*, 2015; Pisoschi et Pop, 2015; Moniczewski *et al.*, 2015). D'autre part, les ERO provoquent une promotion de l'activité athérogène et l'apparition de l'inflammation, donc ils sont des éléments importants dans les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose, l'hypertension et l'insuffisance cardiaque, qui ont relation avec d'autres maladies telles que le diabète et les maladies rénales (Sugamura *et al.*, 2011; Pisoschi et Pop, 2015). Un certain nombre de substances toxiques externes peuvent également contribuer à la production des ERO dans les testicules et l'épididyme, conduisant à une diminution de la viabilité et de la mobilité des spermatozoïdes, et donc une augmentation de l'apparition de la stérilité mâle (Lavranos *et al.*, 2012).

2. LA XANTHINE OXYDORÉDUCTASE

2.1. Structure, mécanisme d'action et distribution

La xanthine oxydoréductase (XOR) est un complexe molybdoflavoprotéique qui catalyse les deux réactions terminales de la dégradation des purines (Battelli *et al.*, 2014a). Structurellement, la XOR est un homodimère de 295 kDa, chaque sous-unité est composée de quatre centres d'oxydoréduction: un centre du cofacteur molybdoptérine (Mo-co), un centre de flavine adénine dinucléotide (FAD), et deux centres fer-soufre (Fe/S) (Kelley, 2015). La xanthine est oxydée en acide urique au centre Mo-co de l'enzyme, et les électrons sont transférés par l'intermédiaire des 2 centres Fe/S vers le centre FAD où le NAD^+ est réduit en NADH pour la forme déshydrogénase (XDH), alors que pour la forme oxydase (XO) l'affinité pour le NAD^+ est diminuée, donc elle est renforcée pour l'oxygène entraînant ainsi le transfert d'électrons monovalents et divalents à l' O_2 pour générer le $\text{O}_2^{\bullet-}$ et le H_2O_2 , respectivement (**Figure 4**) (Cantu-Medellin et Kelley, 2013a; Kelley, 2015). La XOR est très répandu chez

les différentes espèces, elle a été identifiée dans les organismes procaryotes ainsi que dans les plantes et les animaux. Chez les êtres humains, la XOR est exprimée de manière ubiquitaire dans le foie et les intestins affichant donc la plus forte activité spécifique (Cantu-Medellin et Kelley, 2013b; Battelli *et al.*, 2014a). Elle est exprimée aussi dans les poumons, les reins et le myocarde (Cantu-Medellin et Kelley, 2013a; Kelley, 2015). Cette enzyme se trouve également dans les fluides biologiques tels que le sang, le lait, le fluide nasal et la salive (Vorbach *et al.*, 2003; Battelli *et al.*, 2014a).

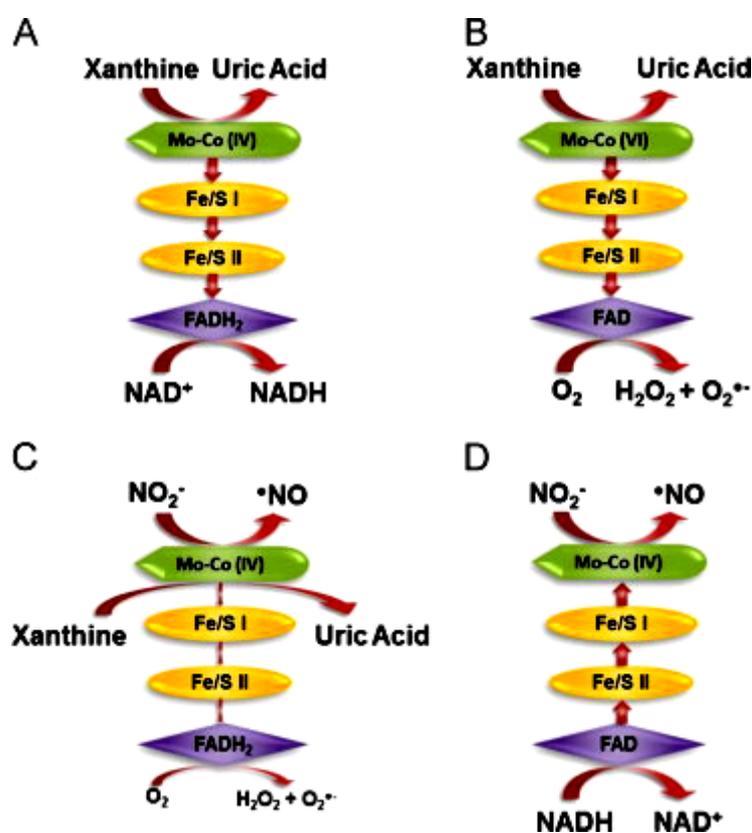


Figure 4: Les réactions catalysées par la XOR. (A) La XDH. (B) La XO. (C) Le nitrite (NO_2^-) est réduit en NO^\bullet au centre Mo-co (l'électron est fourni par la xanthine). (D) Le NO_2^- est réduit en NO^\bullet au centre Mo-co (les électrons sont fournis par le NADH et rétrogradement transférés au centre Mo) (Cantu-Medellin et Kelley, 2013b; Kelley, 2015).

2.2. Rôle physiologique de l'enzyme

La XOR peut cataboliser différents xénobiotiques tels que les agents antiviraux et anticancéreux, contribuant ainsi à la désintoxication du foie. En outre, les ERO et ERA

générés par la XOR sont responsables des fonctions de protection de cette enzyme dans l'immunité innée ainsi que son activité bactéricide, l'absorption du fer dans la muqueuse intestinale, la stimulation de la prolifération, et la défense contre les maladies infectieuses (Battelli *et al.*, 2014a; 2014b). D'autre part, l'acide urique produit par la XOR a un rôle comme un antioxydant et un piègeur très puissant des radicaux libres. (Vorbach *et al.*, 2003; Battelli *et al.*, 2014a).

2.3. Rôle pathologique de l'enzyme

La XOR est responsable des activités pro-inflammatoires et pro-thrombotiques des cellules endothéliales (Cantu-Medellin et Kelley, 2013b; Battelli *et al.*, 2014a; Kelley, 2015). Elle cause la goutte qui est une maladie inflammatoire due à des concentrations élevées de cristaux d'acide urique dans le sérum (Masuda *et al.*, 2014; 2015). D'autre part, les produits oxydants de l'enzyme sont impliqués dans le développement des maladies cardiovasculaires et métaboliques, qui sont les principaux facteurs de risque de l'athérosclérose. Ces ERO sont également responsables de la cytotoxicité et des lésions tissulaires induites par l'ischémie/reperfusion dans l'intestin grêle, l'estomac, le pancréas, le foie, la peau, le muscle squelettique, le cœur, les poumons, les reins et le système nerveux central (**Figure 5**) (Battelli *et al.*, 2014a; 2014b).

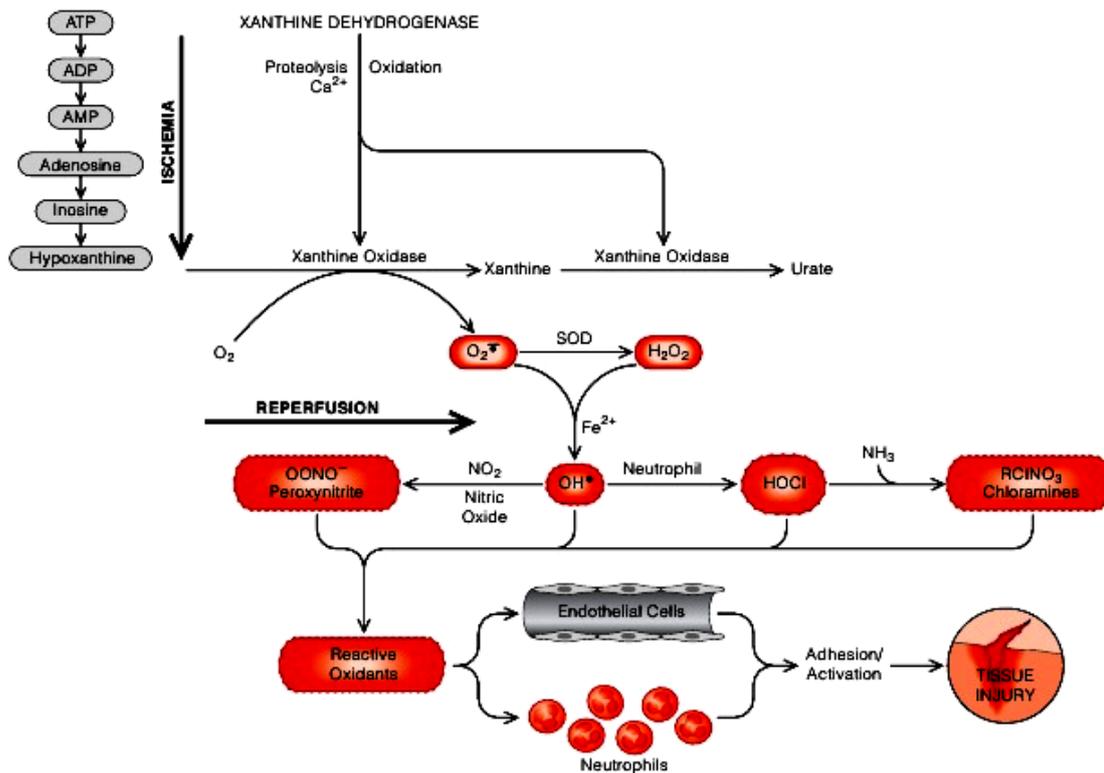


Figure 5: Mécanisme de génération des ERO par la XOR et activation des neutrophiles dans les tissus lors du processus d'ischémie / réperfusion. D'après Francischetti *et al.* (2010); Hatwalne (2012) et Prieto-Moure *et al.* (2014) avec quelques modifications.

2.4. Les inhibiteurs de l'enzyme

L'allopurinol est un analogue structural de l'hypoxanthine et est rapidement métabolisé en oxypurinol qui peut se lier à la XO et inhiber donc son activité (Puddu *et al.*, 2012; Guedes *et al.*, 2014). Mais à cause de la similarité structurale de l'allopurinol et l'oxypurinol aux purines, ils sont donc des substrats pour certaines enzymes du métabolisme des purines et pyrimidines (Okamoto *et al.*, 2013). D'autre part, certains patients montrent une hypersensibilité à l'allopurinol (Liu *et al.*, 2013). En outre, les patients souffrant d'insuffisance rénale ont une excrétion retardée ainsi qu'une concentration sanguine très élevée de ce médicament. Et à cause de ces effets secondaires graves de l'allopurinol, de nouveaux inhibiteurs de la XO ont été cherchés pour le remplacer (Okamoto *et al.*, 2013). Un nouveau médicament (fébuxostat) est un inhibiteur non purique spécifique de la XO, et significativement plus efficace que l'allopurinol (Puddu *et al.*, 2012; Faruque *et al.*, 2013;

Jennings *et al.*, 2014). Contrairement à l'allopurinol, le fébuxostat a de multiples voies d'excrétion (urines et selles) et peut être utilisé en toute sécurité chez les patients présentant une insuffisance rénale (Okamoto *et al.*, 2013).

3. L'INFLAMMATION

3.1. Définition et mécanisme

L'inflammation est un mécanisme de défense de l'hôte contre l'invasion par les agents pathogènes (Headland et Norling, 2015). Mais elle peut avoir des résultats néfastes dans le tissu affecté menant à son dommage surtout si la réaction inflammatoire est non régulée (excès d'intensité ou de temps) (Leza *et al.*, 2015), et accompagnée par la production des ERO et ERA comme le NO qui peut déclencher des réactions d'oxydation toxiques conduisant à une inflammation et des lésions tissulaires (Majdalawieh et Fayyad, 2015). La réaction inflammatoire peut être aiguë ou chronique. L'inflammation aiguë est une réponse immédiate de courte durée (quelques jours à quelques semaines), habituellement, elle disparaît spontanément ou avec un traitement (Charles *et al.*, 2010). La réponse inflammatoire aiguë peut être divisée en trois phases (Prin *et al.*, 2009):

- Une phase d'initiation (réaction vasculaire): elle fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène qui provoque la vasodilatation et donc une rougeur, douleur, fièvre, et gonflement (**Figure 6**) (Kumar *et al.*, 2007; Dorward *et al.*, 2012; Headland et Norling, 2015).

- Une phase d'amplification (réaction cellulaire) (**Figure 6**): caractérisée par la migration et l'activation des cellules inflammatoires (neutrophiles, monocytes / macrophages) (Weill *et al.*, 2003; Raymondjean, 2007; Dorward *et al.*, 2012; Headland et Norling, 2015).

- Une phase de résolution et de réparation: qui tend à régénérer les tissus lésés, pour prévenir la progression de l'inflammation aiguë en inflammation chronique persistante (Weill *et al.*, 2003; Raymondjean, 2007; Serhan, 2011; Dorward *et al.*, 2012; Headland et Norling, 2015).

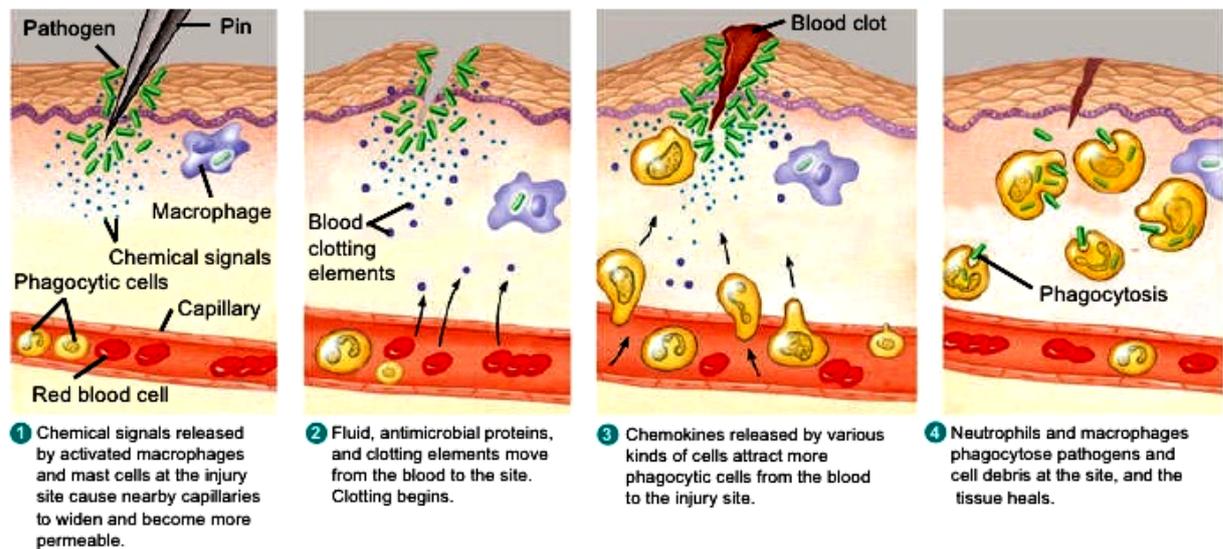


Figure 6: Les événements majeurs dans la réponse inflammatoire aiguë. D'après Dorward *et al.* (2012); Alessandri *et al.* (2013); Buckley *et al.* (2014) avec quelques modifications.

Cependant, un échec dans la résolution provoque une infiltration incontrôlée et persistante des cellules inflammatoires, conduisant ainsi à la progression en inflammation chronique (**Figure 7**) (Nathan et Ding, 2010; Khanna *et al.*, 2010; Lee et Surh, 2012). C'est une inflammation n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée, et qui se développe en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois à plusieurs années (Charles *et al.*, 2010). Elle conduit souvent à une perte des tissus ou des fonctions des organes (Lee et Surh, 2012; Howcroft *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2014).

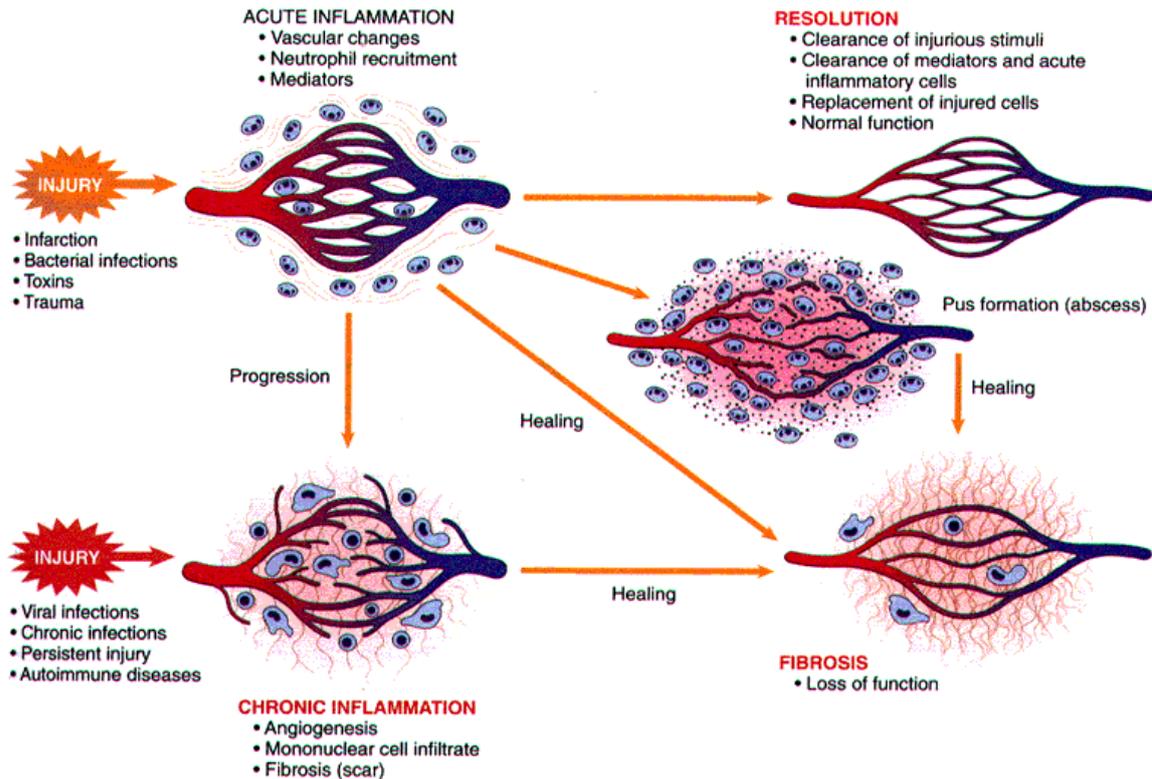


Figure 7: Les résultats de l'inflammation aiguë: résolution, guérison et cicatrisation par fibrose ou inflammation chronique. Adaptée de Kumar *et al.* (2007).

3.2. Pathologies inflammatoires

L'inflammation provoque le développement de plusieurs maladies humaines telles que le cancer, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, les maladies pulmonaires, l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, l'ostéoporose, les maladies neurodégénératives, la maladie d'Alzheimer, et les maladies intestinales inflammatoires (Serhan *et al.*, 2007; Leitch *et al.*, 2008; Khor *et al.*, 2011; Maskrey *et al.*, 2011; Wynn, 2011; Lee et Surh, 2012).

3.3. Les anti-inflammatoires

3.3.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) inhibent une enzyme membranaire, la cyclo-oxygénase (COX), qui transforme l'acide arachidonique en prostaglandines (PG). (Nicolas *et al.*, 2001; Ding, 2002; Lioté, 2011). La COX se présente sous deux formes chez

l'homme, la COX1 et la COX2. Les anti-inflammatoires inhibent ces deux enzymes simultanément, provoquant d'un côté une diminution de l'inflammation, mais de l'autre côté des effets secondaires gastriques (irritation ou ulcération de la muqueuse gastro-intestinale). Cela a conduit à développer des molécules qui ont moins d'effets indésirables, en inhibant seulement la COX2 responsable de l'inflammation, et en maintenant la production des PG de protection gastrique par la COX1. Parmi ces inhibiteurs sélectifs de la COX2 (les coxibs), on compte principalement le Célécoxib et le Rofécoxib (Ding, 2002; Muster, 2005).

3.3.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens: les glucocorticoïdes (GC)

Ce sont des stéroïdes analogues ou précurseurs de la cortisone, naturellement sécrétée par les glandes surrénales à partir du cholestérol. Ils ont une activité anti-inflammatoire très puissante. Les glucocorticoïdes (GC) sont capables d'inhiber toutes les phases de la réaction inflammatoire (Muster, 2005). Le mode d'action des GC se situe essentiellement au niveau transcriptionnel dans les cellules des tissus cibles en intervenant dans la régulation (activation ou inhibition) de la transcription des gènes cibles (Chagnon, 2000; Tournemelle, 2003; Muster, 2005). Les GC inhibent donc la production de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (Laan *et al.*, 1999). Mais l'usage des GC conduit à des troubles aigus tels que l'hypertension artérielle et les ulcères gastro-duodénaux (Henzen, 2003).

3.3.3. Les dérivés salicylés: la sulfasalazine

La sulfasalazine est un dérivé azoïque; c'est une combinaison d'un sulfamide antibactérien (sulfapyridine) et d'un dérivé salicylé (acide 5-amino salicylique (5-ASA)). La sulfasalazine est métabolisée par la flore du côlon pour libérer ses deux composants, qui sont alors capables d'exercer leurs effets anti-inflammatoires. Mais le risque d'effets indésirables associés à ce médicament implique une intolérance digestive et des réactions allergiques (MacDermott, 2000).

3.3.4. Les remèdes traditionnels

Traditionnellement, les plantes médicinales ont été utilisées pour soulager l'inflammation, et les composés phénoliques des plantes ont été signalés à être bénéfiques dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques (Dzoyem et Eloff, 2015). De nombreuses études ont montré que les plantes possèdent une activité inhibitrice des enzymes COX. Ces plantes peuvent donc être une solution dans le traitement des douleurs et des maladies inflammatoires (Larsen *et al.*, 2015). Quelques exemples de plantes douées d'activités anti-inflammatoires sont cités dans le **Tableau 2**.

Tableau 2: Liste de quelques plantes médicinales utilisées en Algérie dans le traitement des maladies inflammatoires humaines (Boudjelal *et al.*, 2013).

Famille et espèce de la plante	Nom local (Partie utilisée)	Utilisations recommandées	Usages dans la littérature
Apiaceae <i>Thapsia garganica</i> L.	Bounafaàe (Parties aériennes, racines)	Anti-inflammatoire, Eczema	Irritation de la peau
Asteraceae <i>Anthemis nobilis</i> L.	Babounje (Fleurs)	Anti-inflammatoire, sédative. Eczema	Anti-inflammatoire
Caryophyllaceae <i>Paronychia argentea</i> L.	Fattet lehdjar, Bssat el-moulouk (Parties aériennes)	Anti-lithiase	Digestive ^(a) . Analgésique gastrique, hypoglycémiant, maladies de la vessie et de la prostate, maladies abdominales, ulcères de l'estomac, calculs rénaux ^(b)
Cupressaceae <i>Juniperus phoenicea</i> L.	Aaràar (Parties aériennes)	Troubles digestifs, éczema, antihypertensive, anti-inflammatoire	Maladies de la peau (eczema) ^(c)
Gentianaceae <i>Erythraea centaurium</i> L.	Marrart lehnach (Fleurs)	Antipyrétique, troubles digestifs	Anti-inflammatoire

Famille et espèce de la plante	Nom local (Partie utilisée)	Utilisations recommandées	Usages dans la littérature
Malvaceae <i>Malva sylvestris</i> L.	Khobeiz (P. aériennes)	Anti-inflammatoire, perte de poids	Emolliente ^(c)
Urticaceae <i>Urtica dioica</i> L.	Horeig (Fleurs)	Antidiabétique, anti-inflammatoire	Antidiabétique ^(d)

^(a) (Novais *et al.*, 2004), ^(b) (Gonçalves *et al.*, 2013), ^(c) (Asgarpanah et Roohi, 2012), ^(d) (Allali *et al.*, 2008).

4. LES SYSTEMES DE DEFENSE ANTIOXYDANTS

Les antioxydants couvrent différentes catégories de composés qui peuvent interférer avec les cycles d'oxydation pour inhiber ou retarder les dommages oxydatifs des biomolécules. Les classes principales des composés ayant une activité antioxydante sont: les vitamines (vitamine C et vitamine E), les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles), les polyphénols (acides phénoliques et flavonoides) (Oroian et Escriche, 2015), les composés contenant du soufre (glutathion et thiorédoxine) (Mukwevho *et al.*, 2014), l'acide alpha-lipoïque et quelques enzymes endogènes spécifiques: superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion réductase (GR) et glutathion peroxydase (GPx) (Moniczewski *et al.*, 2015).

4.1. Les antioxydants enzymatiques

4.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme qui catalyse la conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et dioxygène (Poljsak et Milisav, 2013):

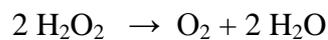


Trois types de superoxyde dismutases peuvent être rencontrés dans les tissus des mammifères: la SOD contenant le zinc-cuivre (SOD1) présent dans le cytosol, la SOD contenant le manganèse (SOD2) trouvés dans la matrice mitochondriale, et la SOD extracellulaire (SOD3). Tous les trois types sont fortement exprimés, principalement dans les

tubules rénaux des reins en bonne santé (Sung *et al.*, 2013). Une étude récente a montré que la SOD1 est une enzyme antioxydante majeure dans le contrôle du stress oxydatif dans des conditions de lésion rénale (Pisoschi et Pop, 2015).

4.1.2. La catalase (CAT)

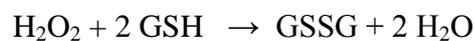
La catalase est une enzyme qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire (Poljsak et Milisav, 2013):



L'un des rôles antioxydant de la CAT est de diminuer le risque de formation du radical hydroxyle à partir du H_2O_2 par la réaction de Fenton (Poljsak et Milisav, 2013). Elle est exprimée dans la majorité des cellules, des tissus et des organes, et à des concentrations élevées dans le foie et les érythrocytes (Pisoschi et Pop, 2015).

4.1.3. La Glutathion Peroxidase (GPx)

La glutathion peroxydase peut catalyser la réduction du H_2O_2 en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme substrat. Elle peut également réduire d'autres peroxydes en alcools (par exemple, les peroxydes lipidiques dans les membranes cellulaires) (Poljsak et Milisav, 2013; Mukwevho *et al.*, 2014; Pisoschi et Pop, 2015):



La GPx est responsable à la désintoxication par des quantités faibles de H_2O_2 , tandis que la catalase prend un rôle principal dans la détoxification cellulaire par des quantités plus élevées de H_2O_2 (Poljsak et Milisav, 2013).

4.2. Les antioxydants non-enzymatiques

L'apport d'antioxydants exogènes est important dans la prévention du stress oxydatif et des dommages cellulaires. Les antioxydants naturels comme la vitamine C et E, les caroténoïdes et les polyphénols sont généralement considérés comme des composants bénéfiques. Leurs propriétés antioxydantes sont souvent prétendu être responsable des effets protecteurs de ces composants alimentaires contre les maladies cardiovasculaires, le cancer et le vieillissement (Poljsak et Milisav, 2013).

4.2.1. Les vitamines

- **La vitamine C (acide ascorbique):** La vitamine C est considérée comme le plus important antioxydant hydrophile étant efficace dans le piégeage des anions superoxydes, les radicaux hydroxyles, le peroxyde d'hydrogène, les espèces réactives de l'azote et l'oxygène singulet (Du *et al.*, 2012; Oroian et Escriche, 2015). Elle protège également les phospholipides membranaires des dommages peroxydante (Pisoschi et Pop, 2015).

- **La vitamine E (alpha-tocophérol):** La vitamine E peut piéger les radicaux peroxydes dans les lipides membranaires biologiques (Raedschelders *et al.*, 2012), et peut donc arrêter la chaîne de peroxydation lipidique (Pisoschi et Pop, 2015). La vitamine E est formée par quatre tocophérols et quatre tocotriénols qui présentent une activité antioxydante (Oroian et Escriche, 2015).

4.2.2. Les caroténoïdes

Les principaux caroténoïdes présents dans le régime alimentaire quotidien sont: les carotènes (α -carotène, β -carotène, lycopène) et les hydroxy-caroténoïdes (xanthophylles-zéaxanthine, lutéine). Les caroténoïdes sont importants non seulement pour leur activité de provitamine A, mais également pour d'autres actions dans les systèmes biologiques y compris leur propriété antioxydante (Nowicka et Kruk, 2012). Le lycopène avec onze doubles liaisons

conjuguées est le piègeur le plus efficace de l'oxygène singulet, et donc l'antioxydant le plus puissant parmi les caroténoïdes naturels (Perretti *et al.*, 2013; de Cortes Sanchez-Mata, 2013). En plus, les carotènes et les xanthophylles sont de bons piègeurs des radicaux libres (Böhm *et al.*, 2012), de bons désactivateur de l'oxygène singulet et donc de bons inhibiteurs de la peroxydation lipidique (Samaniego-Sánchez *et al.*, 2010 ; Ramel *et al.*, 2012).

4.2.3. Le Glutathion réduit (GSH)

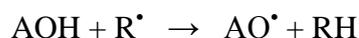
Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide, L- γ -glutamyl-L-cystéinyglycine. C'est l'antioxydant intracellulaire le plus abondant, présent dans toutes les cellules aérobies; eucaryotes et procaryotes (Poljsak et Milisav, 2013). Dans les cellules eucaryotes, le GSH se trouve dans le cytosol (80% - 85%), les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Mukwevho *et al.*, 2014). Il peut piéger le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et l'acide hypochloreux (Sung *et al.*, 2013).

4.2.4. Les composés phénoliques

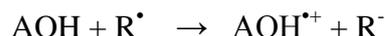
Au-delà de 8000 structures phénoliques ont été signalés et ils sont largement dispersés dans tout le règne végétal et donc dans l'alimentation humaine (Oroian et Escriche, 2015). Les polyphénols peuvent fournir une protection significative contre le stress oxydatif *in-vitro* à des concentrations beaucoup plus faibles que ce qui serait nécessaire pour une protection antioxydante chimique (Weichselbaum et Buttriss, 2010). Ils peuvent exercer un effet antioxydant indirect, en protégeant les enzymes antioxydantes endogènes dans le corps humain (Pradeep et Sreerama, 2015).

Le mécanisme de l'activité antioxydante des polyphénols a été proposé par Leopoldini *et al.* (2011). En premier lieu, la molécule de polyphénol inactive les radicaux libres par des mécanismes de transfert d'atomes d'hydrogène et de transfert d'électrons célibataires. Le

mécanisme de transfert d'atome d'hydrogène suppose que l'antioxydant (AOH), réagit avec le radical libre (R^\bullet), avec transfert d'atome d'hydrogène:



L'autre mécanisme, le transfert d'électrons célibataires, suppose que l'oxydant donne un électron à la molécule antioxydante:



Les produits des réactions des deux mécanismes sont les suivants: une espèce non dangereuse (RH), un radical oxydant (AO^\bullet), un radical cation ($AOH^{\bullet+}$) et une espèce énergétiquement stables (R^-) (Leopoldini *et al.*, 2011).

5. LES POLYPHENOLS

L'intérêt des composés phénoliques alimentaires a augmenté en raison de leurs propriétés antioxydantes et antiradicalaires (Ahmed *et al.*, 2015), et aux activités anti-inflammatoire, anti-microbienne et anti-prolifération et modulation du signal de transduction (Velderrain-Rodríguez *et al.*, 2014). Les principaux groupes de polyphénols sont les acides phénoliques, les flavonoïdes (Oliveira *et al.*, 2014) et les tanins (Crozier *et al.*, 2009).

5.1. Classes principales des polyphénols

5.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques peuvent être divisés en deux catégories en fonction de leur structure: les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Ces composés sont constitués d'un cycle benzène lié à un groupement carboxyle (acides benzoïques) ou à un acide propénoïque (acides cinnamiques). Dans de nombreux fruits et légumes, les acides cinnamiques (acide caféique en particulier) sont présent en tant que dérivés d'ester (acide chlorogénique, d'autres acides quiniques cinnamoyles, glycosides phénylethanoïque) qui

montrent un potentiel élevé comme antioxydants (Sova, 2012). Les acides hydroxybenzoïques comprennent les acides: gallique, *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchuïque, vanilique et syringique. Les acides hydroxycinnamiques les plus importants sont les acides: caféique, férulique, *p*-coumarique et sinapique (**Figure 8**) (Abramovič, 2015).

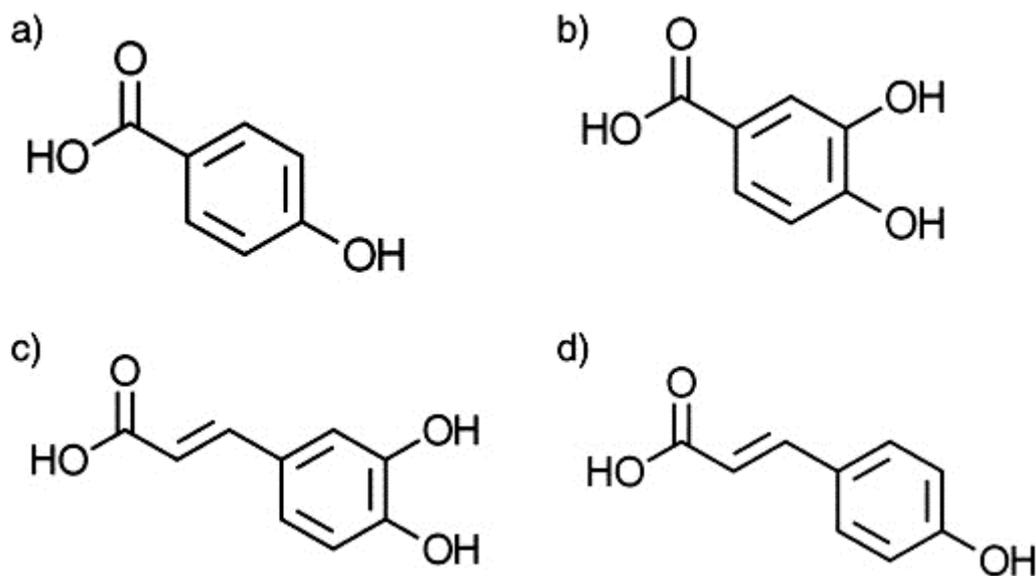


Figure 8: Structures des acides phénoliques: (a) acide *p*-hydroxybenzoïque, (b) acide 3,4-dihydroxybenzoïque, (c) acide caféique, (d) acide *p*-coumarique (Oroian et Escribe, 2015).

5.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux très abondants dans la nature (Majer *et al.*, 2014). La structure générale des flavonoïdes comprend un squelette de 15 atomes de carbone (C6-C3-C6) (**Figure 9**) (Andersen et Jordheim, 2010). Les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs sous-groupes qui sont principalement indiqués soit par: hydroxylation, O-méthylation, C-méthylation, isoprénylation, ou substitution de méthylènedioxy (Oroian et Escribe, 2015).

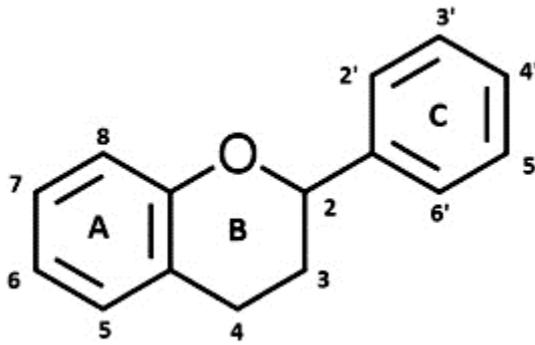


Figure 9: Structure générale des flavonoïdes (Oroian et Escriche, 2015).

Les sous-classes les plus représentatives des flavonoïdes sont: flavones, flavanones, flavonols, flavanols (également appelés flavan-3-ols ou catéchines), anthocyanidines et isoflavones (**Figure 10**) (Zibera *et al.*, 2014).

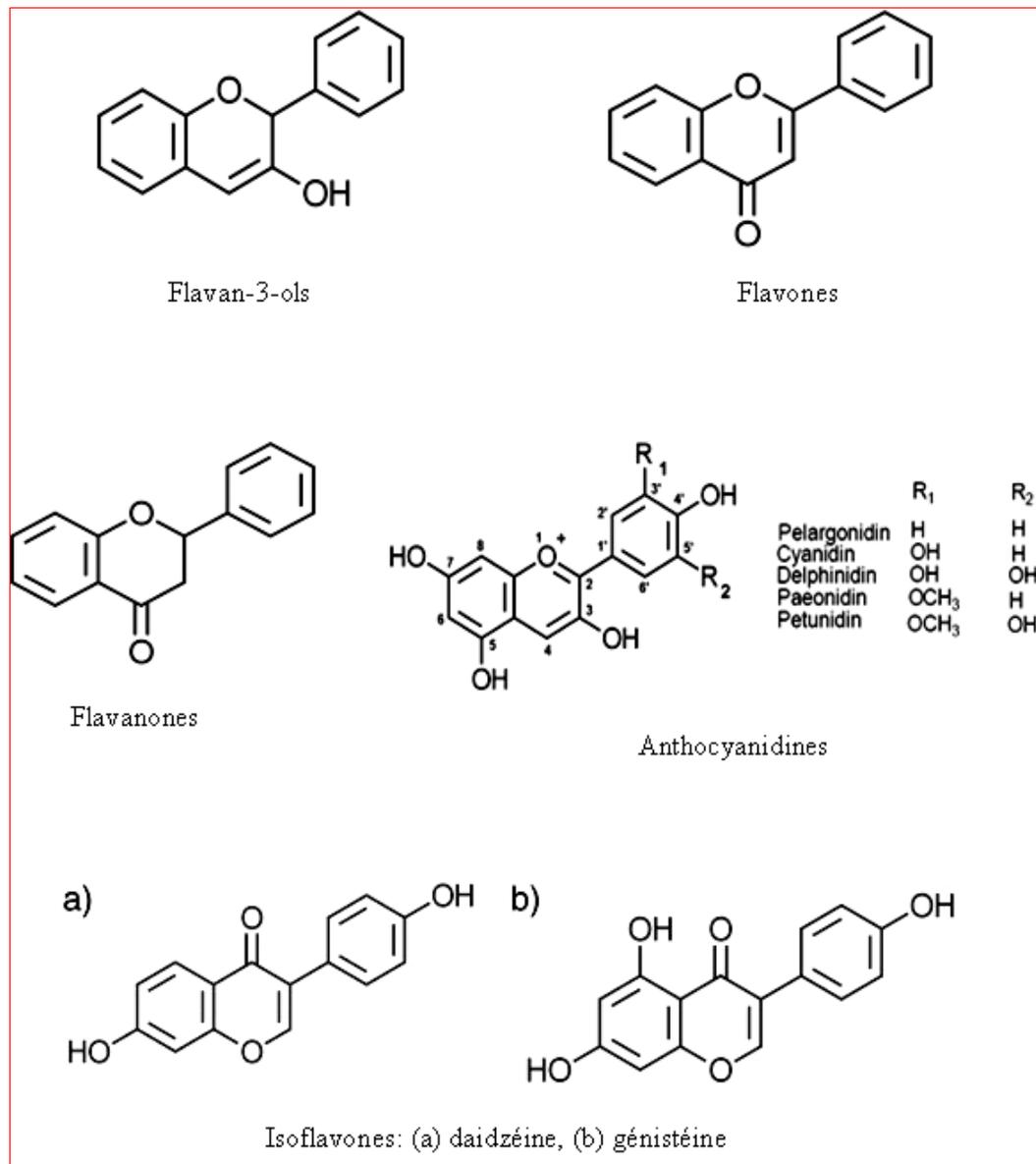


Figure 10: Structures des différentes classes des flavonoïdes (Oroian et Escriche, 2015).

5.1.3. Les tanins

Les tanins sont produits par les plantes comme des métabolites secondaires (**Figure 11**) (Saric *et al.*, 2015). Selon leur structure, les tanins peuvent être divisés en deux classes de macromolécules, les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les tanins hydrolysables ont une masse moléculaire comprise entre 500 et 5000 Da (Arapitsas, 2012). En plus de leur caractère astringent (diminuent les sécrétions et resserrent les tissus) ils ont une activité antioxydante très importante (Shahat et Marzouk, 2013). Les tanins condensés ou

proanthocyanidines sont des polymères de haute masse moléculaire ayant une masse moléculaire allant jusqu'à 30 000 Da.

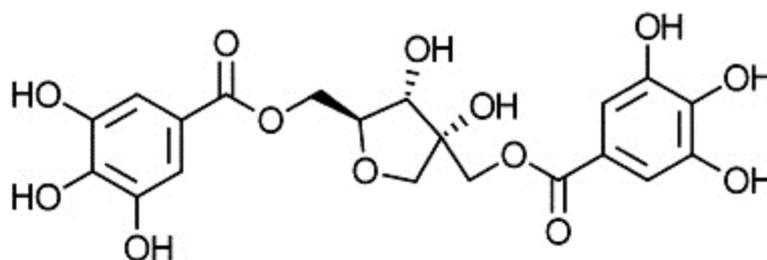


Figure 11: Structure d'un exemple de tanins: le hamamélitanin (Oroian et Escriche, 2015).

5.2. Activités biologiques des polyphénols

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont démontré les avantages des polyphénols pour la santé. Ils présentent des effets vasodilatateurs et sont capables d'atténuer l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL). En outre, ils présentent des effets anti-inflammatoires très clairs, et peuvent moduler les processus apoptotiques dans l'endothélium vasculaire (Quiñones *et al.*, 2013).

5.2.1. Activité antioxydante

Les polyphénols sont connus comme des antioxydants et des piègeurs directs de radicaux libres (Jayasena *et al.*, 2013). L'effet protecteur global des polyphénols est principalement dû à leur large gamme d'actions biologiques, tels que les capacités de piégeage des radicaux libres, de chélation des métaux et de modulation des enzymes (Rodrigo *et al.*, 2011).

- **Piégeage des radicaux libres (scavenging effect):** Les polyphénols peuvent piéger les radicaux libres, empêchant ainsi la peroxydation des lipides (Boban et Modun, 2010). Les polyphénols diminuent les taux tissulaires des ERO et du MDA (Fenercioglu *et al.*, 2010). Les flavonoïdes comme la catéchine ou la quercétine peuvent directement piéger les ERO, tels que l' $O_2^{\cdot-}$, le H_2O_2 ou le HOCl. La quercétine, la myricétine et le kaempférol, sont les flavonoïdes avec la plus grande activité de neutralisation des radicaux libres. Les polyphénols

peuvent agir directement en capturant les électrons non appariés des ERO, générant ainsi des espèces moins réactifs. Les flavonoïdes piègent les radicaux libres pour générer le radical flavine, qui est beaucoup moins réactif (**Figure 12**) (Quiñones *et al.*, 2013).

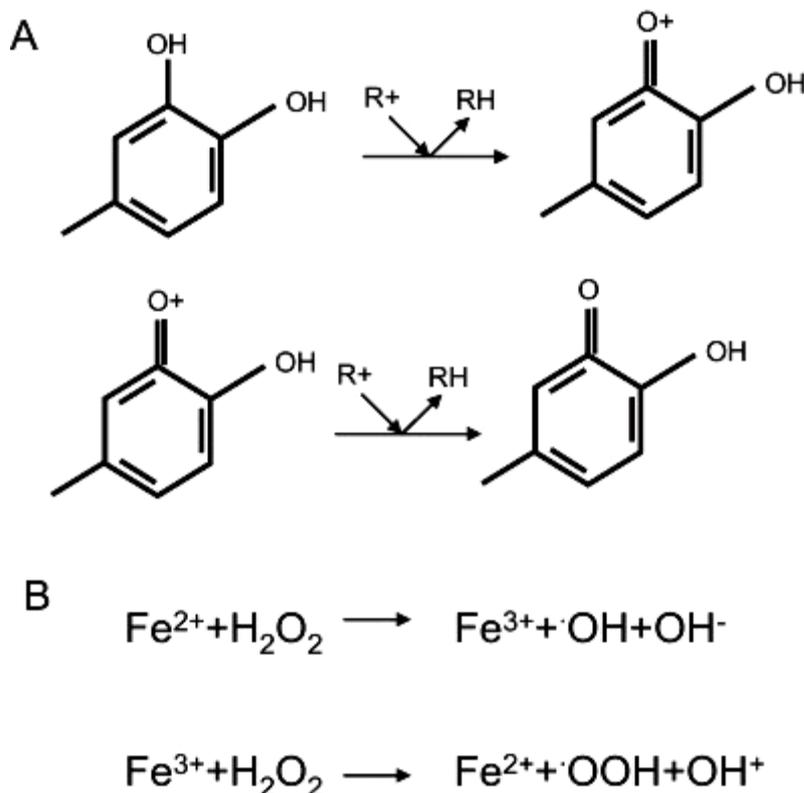


Figure 12: (A) La formation du radical flavinique par l'effet scavenger des polyphénols sur les radicaux libres. (B) Réaction de Fenton (Quiñones *et al.*, 2013).

- **Chélation des métaux de transition:** Les polyphénols peuvent agir comme des chélateurs des métaux de transition (Jayasena *et al.*, 2013), et donc l'inhibition de la formation des radicaux libres (Jomova *et al.*, 2010). La chélation des métaux de transition tel que le Fe^{2+} peut réduire directement la vitesse de la réaction de Fenton empêchant ainsi l'oxydation provoquée par les radicaux hydroxyles hautement réactifs (Jayasena *et al.*, 2013). Le polyphénol épigallocatechine gallate est un chélateur très puissant des métaux de transition tels que le cuivre et le fer, et inhibe ainsi plus de 90% des dommages de l'ADN (Mandel *et al.*, 2011). La quercétine chélate le fer intracellulaire, ce qui évite son effet catalysant la formation des ERO. Les flavonoïdes présentent une capacité antioxydante très élevée dans la

peroxydation induite par les ions métalliques que dans la peroxydation induite par le radical peroxyde. De plus, le nombre de groupements OH et leurs positions sur les cycles des flavonols déterminent la capacité antioxydante de ces molécules (Rodrigo *et al.*, 2011).

- **Modulation des enzymes:** Les polyphénols peuvent stimuler les enzymes antioxydantes telles que la glutathion peroxydase, la catalase et la superoxyde dismutase, et inhiber l'expression des enzymes impliquées dans la génération des radicaux libres telle que la xanthine oxydase (Alvarez-Suarez *et al.*, 2011). La stimulation de la SOD par le resvératrol a été démontrée dans les cellules endothéliales et dans les myoblastes cardiaques. Le resvératrol régule également la catalase et la glutathion peroxydase dans les segments aortiques et dans les cellules des muscles lisses vasculaires (Quiñones *et al.*, 2013). Cet effet antioxydant empêche les dommages oxydatifs aux composants cellulaires importants et conduit à une recherche sur les polyphénols comme vasodilatateurs, antithrombotiques, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques, hypolipémiants ou des agents anti-athérogènes (Jayasena *et al.*, 2013; Quiñones *et al.*, 2013).

5.2.2. Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des composés phénoliques a été démontrée dans de nombreuses études *in-vitro* et *in-vivo* (Santangelo *et al.*, 2007). Le stress oxydatif provoque une augmentation des activités des enzymes telles que la cyclo-oxygénase (COX) et la lipooxygénase (LPO) qui sont impliquées dans la libération des facteurs tels que les interleukines et les chimiokines (Quiñones *et al.*, 2013). Les polyphénols expriment une activité anti-inflammatoire en modulant l'expression de ces gènes pro-inflammatoires (COX, LPO, NO synthases et plusieurs cytokines) (Capiralla *et al.*, 2012).

5.2.3. Activité anticancéreuse

Les polyphénols ont un potentiel à arrêter la progression du cancer en modulant la prolifération et en stimulant la mort cellulaire par un effet toxique direct ou par modulation de l'expression de différents facteurs pro-apoptotiques (Link *et al.*, 2010; Rodrigo *et al.*, 2011; Quiñones *et al.*, 2013). Les flavanones peuvent être efficaces contre la carcinogénèse en minimisant les dommages de l'ADN, le développement des tumeurs et la prolifération cellulaire (Khan *et al.*, 2014). En outre, d'autres flavonoïdes, comme la quercétine, ont des effets anticancéreux par inhibition de la prolifération cellulaire et induction de l'apoptose (Cardona *et al.*, 2013).

5.2.4. Activité antidiabétique

Les polyphénols ont un effet contre le diabète de type 2 (DT2) par inhibition des disaccharidases (α -amylase et α -glucosidase) dans la lumière intestinale. Cela peut limiter la digestion des polysaccharides dans l'alimentation, ce qui réduit donc l'absorption des sucres simples. Les polyphénols peuvent également exercer des effets antidiabétiques importants en améliorant l'absorption du glucose dans les muscles et les adipocytes (Hanhineva *et al.*, 2010; Anhê *et al.*, 2013). Par exemple, la catéchine, qui a un effet hypoglycémiant dû à une inhibition de la α -glucosidase, la α -amylase et la sucrase (Rodrigo *et al.*, 2011). Les polyphénols peuvent également protéger les cellules β pancréatiques de la glucotoxicité et peuvent améliorer la sécrétion d'insuline, minimisant ainsi le DT2 (Anhê *et al.*, 2013).

5.2.5. La protection cardiovasculaire

Les polyphénols jouent un rôle dans la protection du système cardio-vasculaire, grâce à la réduction du stress oxydatif et de l'inflammation qui sont impliqués dans les maladies cardiovasculaires. Les polyphénols agissent à différents niveaux sur le système cardiovasculaire, tels que la fonction endothéliale, l'athérosclérose et l'agrégation plaquettaire

(Rodrigo *et al.*, 2011). La naringine a un effet anti-athérosclérose en cas d'hypercholestérolémie, ce qui peut conduire à la préservation de la paroi vasculaire (Chanet *et al.*, 2012a; 2012b). Les polyphénols sont également capables de fixer le LDL et d'augmenter les taux des lipoprotéines de haute densité (HDL). Une diminution du rapport cholestérol total / HDL et une diminution du taux des triglycérides, fournissent une preuve convaincante pour de nombreuses bénéfices des polyphénols contre les risques cardiovasculaires (Scoditti *et al.*, 2014).

4.2.6. D'autres effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols alimentaires, peuvent aider à prévenir l'apparition de la maladie d'Alzheimer (Pasinetti *et al.*, 2015). Ils possèdent également des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales très puissantes (Rodrigo *et al.*, 2011), ainsi qu'un effet contre le vieillissement (Xia *et al.*, 2010) et certains effets sur les lésions gastriques et hépatiques, la protection de l'intestin et la stabilité des cellules rouges sanguines (Quiñones *et al.*, 2013).

6. PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE: *Paronychia argentea* L.

6.1. Description et caractérisation

Paronychia argentea, appartenant à la famille des Caryophyllaceae, est une plante vivace largement distribuée en Algérie, et elle est généralement connue comme le thé arabe (Sait *et al.*, 2015), ou le thé Algérien (Bouanani *et al.*, 2010). C'est une plante herbacée de 30 à 50 cm de long, pousse en tapis, articulée, allongée, pubescente par des poils courts (Braca *et al.*, 2008). Les feuilles, jusqu'à 5 mm de long et 2 mm de large, ne sont pas poilues, elles sont lancéolées linéaires et parfois ovales avec des pointes aiguës. Les lobes du calice sont de forme oblongue avec des marges membraneuses à capuchon et se terminant par une arête aiguës à la pointe. Les fleurs sont blanches-argentées et denses, mélangées avec les feuilles, en têtes latérales et terminales (Hamdan et Afifi, 2004; Afifi *et al.*, 2005). La période de

floraison de *P. argentea* a lieu de Avril à Juin. La plante pousse sur des sols secs, sableux et graveleux, et préfère une exposition ensoleillée. *Paronychia argentea* provient de la péninsule Ibérique, la France, la péninsule d'Appenin, la péninsule Balkanique, la Turquie, le Levant, l'Asie du Sud-Ouest et l'Afrique du Nord (Brickell, 2003; Erhardt *et al.*, 2008).

6.2. Dénomination et taxonomie

Paronychia argentea a été décrite et dénommée en 1805 par Jean-Baptiste Pierre Antoine deMonet deLamarck (Brickell, 2003; Erhardt *et al.*, 2008). Le nom *Paronychia* est dérivé du nom composé grec ancien: $\pi\alpha\rho\omega\nu\chi\acute{\iota}\alpha$ = [$\pi\alpha\rho\acute{\alpha}$: auprès ou voisin] + [$\acute{\omicron}\nu\chi\acute{\iota}$: ongle], c'est-à-dire abcès proche de l'ongle (la maladie du panaris), car la forme du calice de la plante est semblable à un ongle. Le nom *argentea* est dérivé du nom latin: *argenteus* ou *argentum* = d'argent (couleur argent, argenté) (Servais et Seba, 2014). Donc les noms communs de cette plante sont comme suit: (Arabe: Kessaret lahdjar, Fettat lahdjar, Bsate el moulouk) (Boudjelal *et al.*, 2013), (Français: Herbe-au-panaris, Paronyque argentée, Thé arabe), (Anglais: Silver Nailwort, Silvery Paronychia, Whitloewort, Mountain-knot-grass, Algerian Tea) (Servais et Seba, 2014).

- **Taxonomie de *Paronychia argentea* Lam.**

Règne: Plantae

Division: Magnoliophyta

Embranchement: Phanerogames

Sous Embranchement: Angiospermes

Classe: Eudicotyledons

Ordre: Caryophyllales

Famille: Caryophyllaceae

Genre: *Paronychia*

Espèce: *Paronychia argentea*

6.3. Propriétés biologiques et toxicité

P. argentea est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter ou prévenir plusieurs maladies comme l'urolithiase (Boudjelal *et al.*, 2013; Chaussemier *et al.*, 2015). Ses parties aériennes sont utilisées dans la médecine populaire Algérienne pour le traitement des maladies rénales et le diabète (Gonçalves *et al.*, 2013; Nawash *et al.*, 2013; Sait *et al.*, 2015). Cette plante est également utilisée comme analgésique gastrique, et pour traiter les ulcères de l'estomac, l'anorexie, les flatulences, les maladies abdominales, les maladies de la vessie et de la prostate, ainsi que les calculs rénaux et les douleurs cardiaques (Ferreira *et al.*, 2006; Al-Bakri et Afifi, 2007; Bouanani *et al.*, 2010; Boudjelal *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2013; Sait *et al.*, 2015).

La protection rénale et les effets anti-urolithiasiques de *P. argentea*, ont été prouvés par Bouanani *et al.* (2010). En 2014, Belarbi et ses collaborateurs ont constaté que *P. argentea* agit comme un bon anti-précipitant du carbonate de calcium (CaCO₃). Ce qui peut contribuer à la validation de son utilisation médicinale pour traiter les calculs rénaux (Chaussemier *et al.*, 2015). D'autre part, Hamdan et Afifi (2004) et Sait et ses collaborateurs (2015) ont démontré que l'activité hypoglycémiant de cette plante est due à l'inhibition de la α -amylase par ses différents flavonoïdes aglycones et glycosides. Plusieurs études ont également justifié l'activité antioxydante des extraits alcooliques et aqueux de *P. argentea* en utilisant différents tests antioxydants (Ferreira *et al.*, 2006; Zama *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2013; Sait *et al.*, 2015). Par ailleurs, Al-Bakri et Afifi (2007), ont conclu que l'extrait éthanolique de *Paronychia argentea* a montré une activité antimicrobienne élevée contre *Bacillus subtilis*, et faible contre *Escherichia coli*.

Les analyses toxicologiques de *P. argentea* ont été effectuées par Bouanani *et al.* (2010) dans des modèles de rats. L'administration orale des extraits de *P. argentea* n'a pas provoqué des altérations significatives dans presque tous les paramètres biochimiques et

hématologiques chez les animaux traités. En outre, aucun symptôme toxique ou décès n'a été observé chez tous les animaux au cours des 14 jours de l'expérience. Par conséquent, la dose létale minimale (DL₅₀) de l'extrait aqueux et butanolique de la partie aérienne de *P. argentea* est supérieur à 2000 mg/kg et 40 mg/kg, respectivement (Bouanani *et al.*, 2010).

6.4. Composition chimique

Les principaux constituants de l'extrait aqueux de *P. argentea* sont les flavonoïdes, les composés phénoliques et les terpénoïdes (Al-Bakri et Afifi, 2007; Belarbi *et al.*, 2014; Chaussemier *et al.*, 2015). Par contre, l'analyse phytochimique de cet extrait a montré l'absence d'alcaloïdes (Al-Bakri et Afifi, 2007). En 2015, Sait et ses collaborateurs ont analysé les flavonoïdes de la décoction de *P. argentea*, ils ont ainsi identifié onze composés, et six d'entre eux ont été trouvés dans cette plante pour la première fois (la isorhamnétine, la isorhamnétine-3-O-dihexoside, la quercétine, la quercétine-3-O-glucoside, la quercétine-méthyl-éther-O-hexoside et la jaceosidine). La caractérisation des flavonoïdes de *P. argentea* peut donc contribuer à la validation de ses utilisations en médecine traditionnelle (Sait *et al.*, 2015).

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel biologique

La partie aérienne de la plante *Paronychia argentea* (Bsat elmoulouk) a été récoltée au stade de floraison (Avril-Mai 2011) de la région montagneuse Ouled Rahmoune (Constantine) (**Figure 13**), et identifiée par le professeur OUDJEHIIH Bachir (Université El-Hadj Lakhdar, Batna). Les échantillons ont été séchés à l'air pendant 10 jours à température ambiante, puis la plante séchée (tiges, feuilles et fleurs) a été utilisée pour les analyses. Le lait bovin frais a été obtenu d'une ferme des environs de Sétif pour l'extraction et la purification de la xanthine oxydase. Des souris *Swiss albinos* mâles, dont le poids varie entre 20 et 30g, ont été obtenues auprès du Laboratoire de Physiologie Animale, Université Constantine 1 (Constantine, Algérie). Ils ont été maintenus dans notre laboratoire à une température de 25 ± 2 °C avec un cycle de 12 h de lumière/obscurité. Ils ont été autorisés un accès libre à l'eau du robinet et à leurs propres aliments commerciaux.

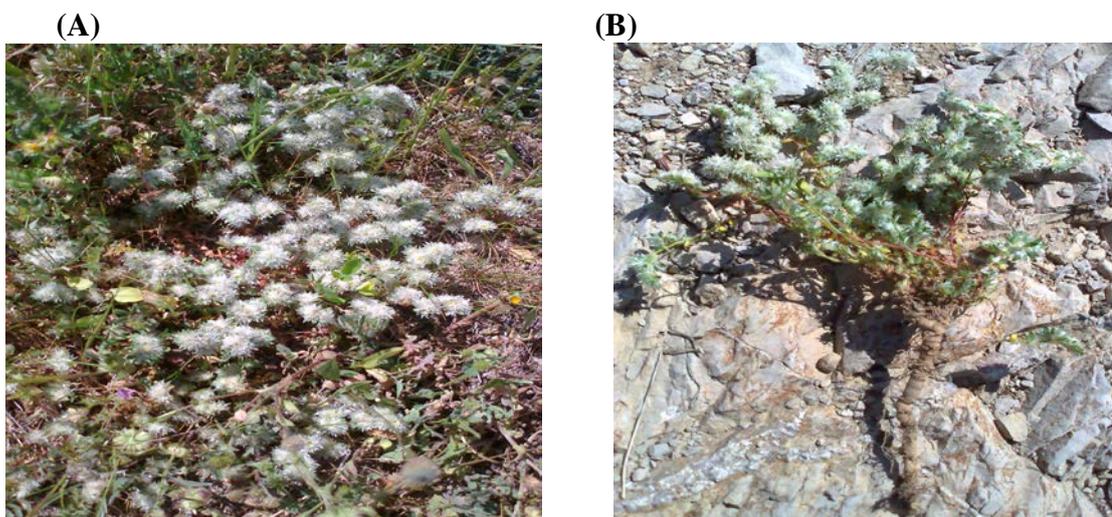


Figure 13: Photos de *Paronychia argentea* prises en période de floraison (Avril 2011). (A) la partie aérienne, (B) la plante entière.

2. Méthodes

2.1. Extraction des polyphénols de *Paronychia argentea*

La partie aérienne (tiges, fleures et feuilles) de la plante *P. argentea* a été bien nettoyée et séchée à température ambiante, ensuite broyée afin d'obtenir une poudre. Cette poudre (500g) a été ensuite macérer à température ambiante dans le méthanol (5 L) pendant 48 h, en remuant de temps en temps (Nana *et al.*, 2011). Le mélange résultant a été filtré, et le filtrat a été concentré par évaporation du méthanol à 40 °C sous pression réduite en utilisant un évaporateur rotatif (BÜCHI). L'extrait a été séché pendant une nuit dans une étuve à 30 °C, puis stocké jusqu'à utilisation.

D'autre part, l'extraction des polyphénols a été effectuée selon la méthode décrite par Markham (1982), en utilisant des solvants organiques à polarité croissante (**Figure 14**). Le broyat de *P. argentea* (100 g) a été additionné à 1 litre de méthanol / eau distillée (85/15 %), le mélange a été soumis à une agitation pendant une nuit à 4 °C, puis laissé reposer quelques heures, ensuite filtré. Le filtrat a été conservé à 4 °C alors que le précipité a été soumis à une deuxième extraction en suivant le même protocole avec 1 litre de méthanol / eau distillée (50/50 %). Le deuxième filtrat a été mélangé avec le premier, et le mélange a été filtré pour la dernière fois sur papier filtre et soumis à une évaporation rotative à 40 °C pour éliminer le méthanol. L'extrait obtenu est considéré comme étant l'extrait brut (EBr). Un volume de 50 mL de l'EBr a été séché jusqu'à élimination de l'eau puis conservé jusqu'à son utilisation. L'autre fraction de l'EBr a été initialement mélangée avec l'hexane et laissé décanter, et la phase organique supérieure a été récupérée. L'extraction est refaite plusieurs fois jusqu'à ce que le solvant (hexane) devient transparent. L'hexane est par la suite évaporé et l'extrait résultant est considéré comme étant la fraction de l'hexane (EHx). La phase aqueuse résiduelle est soumise à une autre extraction par le chloroforme, et enfin par l'acétate d'éthyle

en suivant les mêmes étapes que par l'hexane. Cinq fractions sont ainsi obtenues; l'EBr, l'EHx, la fraction du chloroforme (ECh), la fraction de l'acétate d'éthyle (EAc) et la fraction aqueuse (EAq) résiduelle. Les cinq fractions ont été séchées et conservées jusqu'à l'utilisation.

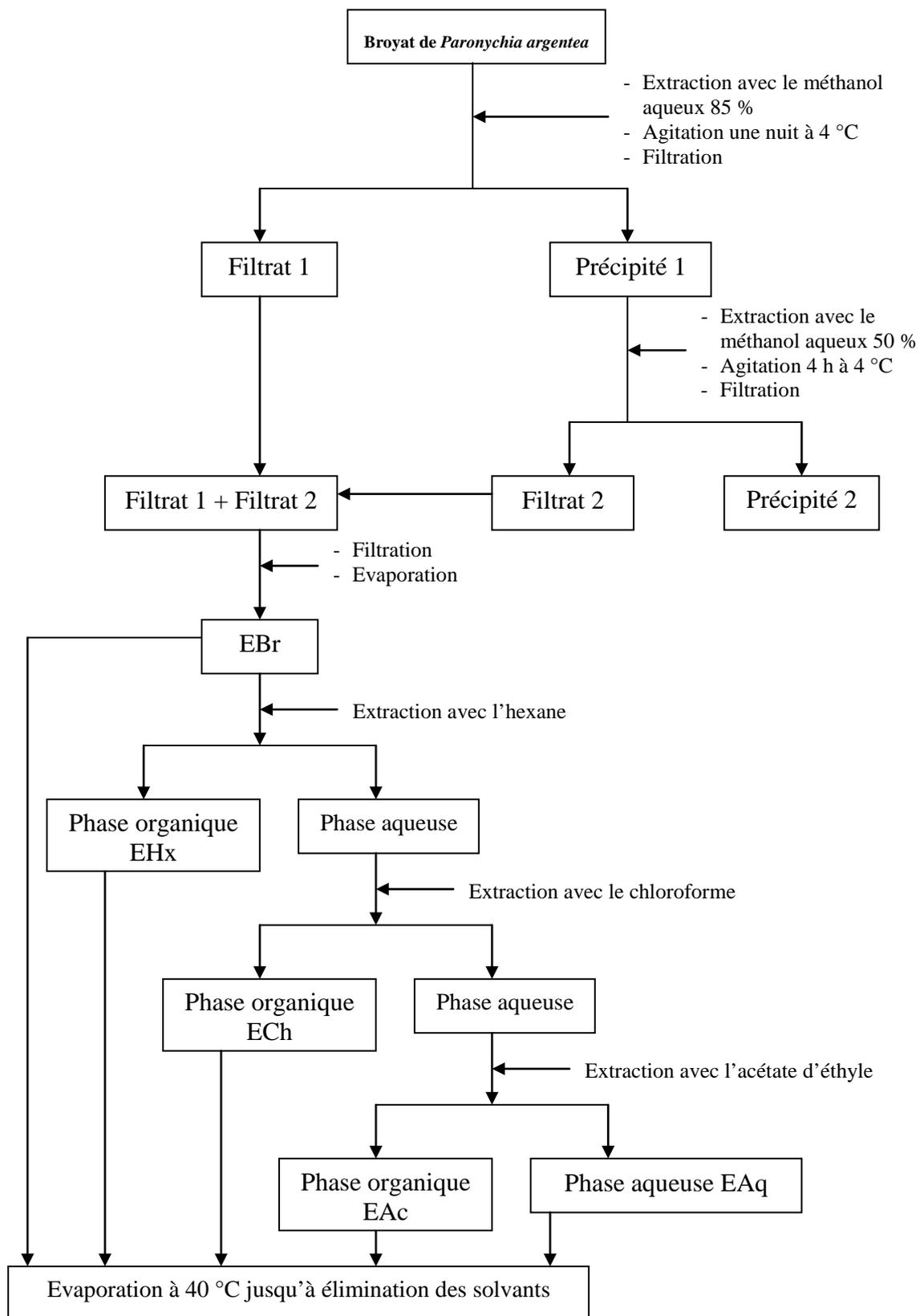


Figure 14: Etapes de l'extraction des polyphénols de *P. argentea* par la méthode de Markham (1982). (EBr) extrait brut, (EHx) extrait d'hexane, (ECh) extrait du chloroforme, (EAc) extrait d'acétate d'éthyle, (EAq) extrait aqueux.

2.2. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux dans les extraits de *P. argentea* ont été déterminés avec le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Li *et al.* (2007) avec une légère modification. En bref, 0.1 mL de chaque extrait de *P. argentea* étaient bien mélangés avec 2.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu, après 5 min on a ajouté 1.0 mL de Na₂CO₃ (20%). Après 1h d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 760 nm. La teneur en polyphénols totaux a été estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (**Figure 15**) établie avec l'acide gallique (0-160 µg/ml), et exprimée en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EqAG/mg d'extrait).

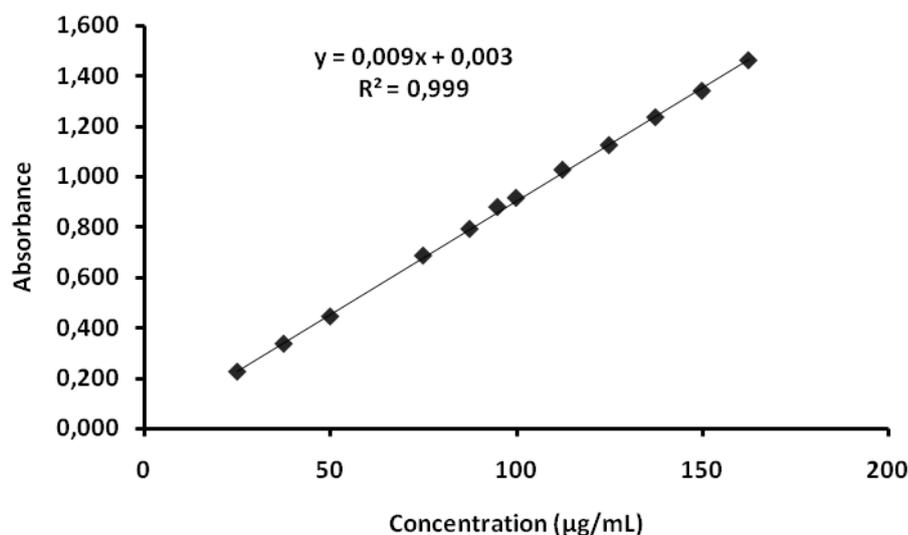


Figure 15: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3).

2.3. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes des extraits de *P. argentea* ont été quantifiés par la méthode du trichlorure d'aluminium basée sur la formation d'un complexe flavonoïde-aluminium, ayant une absorbance maximale à 430 nm (Bahorun *et al.*, 1996): 1 mL de chaque échantillon (préparés dans l'eau distillée ou dans le méthanol) avec des concentrations convenables, a été

ajouté à 1 mL de la solution d' AlCl_3 (2 %, dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans chaque extrait a été calculée à partir des courbes d'étalonnage établies avec la quercétine et la rutine (0-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figure 16**), chacune a été préparée dans le méthanol, et exprimée en milligrammes équivalents de quercétine ou de rutine par grammes d'extrait (mg EQ ou R / g).

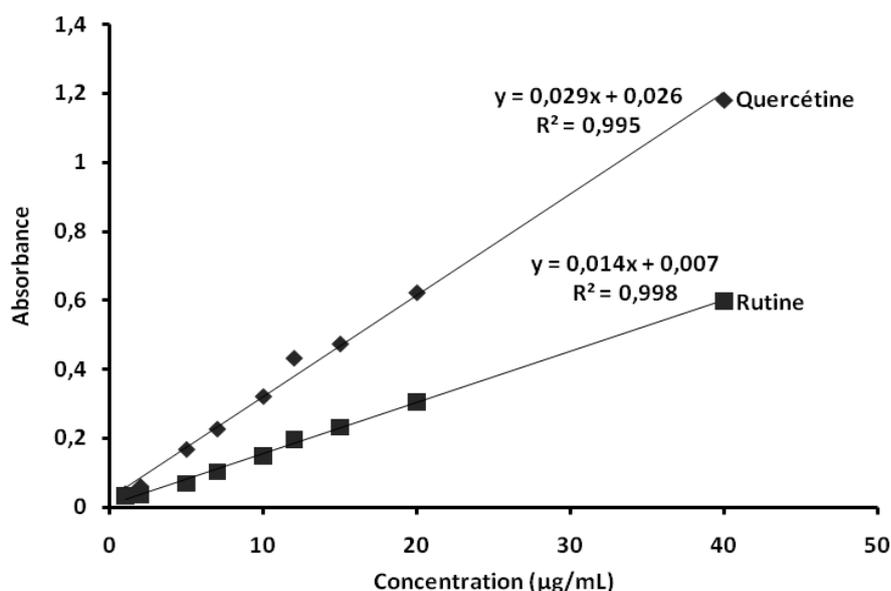


Figure 16: Courbes d'étalonnage de la quercétine et de la rutine. Chaque point des deux courbes représente la moyenne \pm SD ($n = 3$).

2.4. Purification de la xanthine oxydase

La purification de la xanthine oxydase du lait bovin frais a été réalisée selon la méthode de Baghiani *et al.* (2003); le lait bovin a été centrifugé à 5000 rotations par minute (rpm) pendant 20 minutes. La crème flottante a été dissoute dans un volume double de phosphate de potassium (K_2HPO_4 , 0.2 M) contenant 1 mM d'EDTA et 5 mM de DTT. Le mélange a été soumis à une agitation douce pendant 2 heures puis centrifugée à 6000 rpm pendant 20 min. Le surnageant récupéré a été filtré sur laine de verre et additionné progressivement de 15 % (V/V) du butanol froid (-20°C) et de sulfate d'ammonium 15 % (P/V), sous agitation douce pendant 1 heure, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 20 min. Après filtration du surnageant

sur laine de verre, la XOR a été précipitée par ajout progressif de sulfate d'ammonium 20 % (P/V), sous agitation douce pendant 1 heure et 30 min, puis centrifugation à 11000 rpm pendant 30 min. Le précipité (couche supérieure brunâtre) a été récupéré doucement et resuspendu dans un petit volume de tampon héparine (15-20 mL, NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 25 mM, contenant 1 mM d'EDTA, pH 6.2), et dialysé contre ce même tampon pendant une nuit sous agitation. Afin d'éliminer les impuretés insolubles, le dialysat a été centrifugé à 18000 rpm pendant 60 min. Après filtration à travers un filtre de 45 μm de diamètre, le produit final constitue l'extrait brut de la XOR.

L'extrait brut obtenu a été déposé sur une colonne chromatographique contenant un gel d'héparine-agarose équilibré et lavée par le tampon héparine. La colonne a été ensuite lavée par le même tampon renfermant 0.1 M de NaCl. La XOR a été récupérée de la colonne par le tampon héparine contenant 0.2 M de NaCl, et dialysée contre un tampon Bicine 50 mM, pH 8.3, pendant une nuit. Enfin, l'enzyme a été répartie en aliquotes de 0.5 mL et conservée à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ jusqu'à son utilisation.

Remarque: Toutes les étapes ont été effectuées à $4\text{ }^\circ\text{C}$.

2.4.1. Contrôle de pureté de la XOR

La pureté de l'enzyme purifiée a été estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) et par le rapport protéine / flavine PFR (Protein to Flavin Ratio), correspondant à la lecture de l'absorbance aux longueurs d'ondes 280 nm et 450 nm ($A_{280\text{nm}} / A_{450\text{nm}}$). Une valeur 5 ou proche de 5 indique une grande pureté (Bray, 1975).

2.4.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) a été réalisée selon la méthode de Laemmli (1970): le gel de séparation (10 % d'acrylamide et 2.74 % de bis-acrylamide) a été préparé dans un tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1 % de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.042 % de N,N,N',N' Tetramethylene diamine (TEMED) (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Le gel de concentration a été préparé dans le même tampon Tris-HCl (0.125 M, pH 6.8) contenant 0.1% de SDS (P/V) et polymérisé par ajout de 0.1% de TEMED (V/V) et 0.1% de persulfate d'ammonium (P/V). Les échantillons (XO, environ 1 mg/ml) ainsi que les standards des poids moléculaires (1 mg/mL) ont été préparés dans une solution échantillon constituée d'un tampon Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), 2 % de SDS (P/V), 20 % de glycérol (V/V) et 0.005 % de bleu de bromophénol (P/V). Ensuite, ils ont été chauffés à 100 °C pendant 5 minutes. Les standards des poids moléculaires (Sigma) utilisés sont de 29000 Da à 205000 Da.

La migration électrophorétique a été réalisée dans un tampon Tris-HCl (25 mM) contenant 0.192 M de glycine et 0.1 % de SDS (P/V) par application d'un courant électrique de 10 mA jusqu'à ce que les protéines pénètrent dans le gel de séparation, l'ampérage a été ensuite augmenté jusqu'à 37- 45 mA. Les protéines séparées ont été colorées pendant au moins une heure dans une solution de bleu de Coomassie 0.2 % (P/V) contenant 10 % d'acide acétique (V/V), 45 % de méthanol (V/V) dans de l'eau distillée. Le gel a été ensuite décoloré par une solution d'acide acétique 5-10 % (V/V).

2.4.3. Estimation de l'activité enzymatique de la XOR

L'activité totale de la XOR a été estimée en suivant l'augmentation de la production de l'acide urique à 295 nm, en présence de 100 µM de xanthine comme substrat de l'enzyme et 500 µM de NAD⁺ comme accepteur d'électrons dissous dans un tampon Na-Bicine à pH 8.3

(Baghiani *et al.*, 2002). L'activité de la forme oxydase a été mesurée par la même méthode mais en absence de NAD⁺:

$$\text{Activité enzymatique totale} = \text{activité de la XO} + \text{activité de la XDH}$$

L'activité spécifique de l'enzyme a été exprimé en nombre de nano mole d'acide urique produit dans une minute par milligramme de l'enzyme (nmols / min / mg de protéine).

2.5. Activité antioxydante des extraits de *P. argentea* en utilisant des tests *in-vitro*

2.5.1. Effet inhibiteur de l'activité de la xanthine oxydase

L'effet inhibiteur des extraits de *P. argentea* sur l'activité de la XO a été étudié spectrophotométriquement en suivant la quantité de l'acide urique produit par oxydation de 100 µM de xanthine dissous dans un tampon phosphate de sodium saturé en O₂ (Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄, 50 mM, pH 7.4, contenant 0.1 mM d'EDTA), en présence de plusieurs concentrations de chaque extrait de *P. argentea* (Boumerfeg *et al.*, 2009). L'absorbance a été lue à 295 nm, et l'activité inhibitrice de ces extraits a été comparée par rapport au standard allopurinol qui est l'inhibiteur spécifique de la XO. Après ajout de la XO, la réaction a été suivie pendant 60 secondes et l'activité inhibitrice des extraits de *P. argentea* a été exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) calculé ainsi:

$$I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C: absorbance en absence de l'extrait (contrôle négatif)

A_E: absorbance en présence de l'extrait

L'IC₅₀ de chaque extrait (concentration inhibitrice de 50 % de l'activité enzymatique) a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en

fonction de la concentration de l'inhibiteur ($Y = a X + b$). Elle a été exprimée en mg/mL et comparée avec celle de l'allopurinol:

$$IC_{50} = (50 - b) / a$$

2.5.2. Effet scavenger sur le radical superoxyde produit par la XO

L'effet scavenger des extraits de *P. argentea* sur l' $O_2^{\cdot -}$ produit par la XO a été déterminé en suivant la réduction du cytochrome c à 550 nm (Robak et Gryglewski, 1988). Le milieu réactionnel a été composé d'un tampon phosphate de sodium (50 mM, pH 7.4, 0.1 mM d'EDTA) bien saturé en oxygène aérien, contenant 100 μ M de xanthine et 25 μ M de cytochrome c et en présence de plusieurs concentrations de chacun des extraits de *P. argentea*. La réaction est suivie pendant 60 secondes après ajout de la XO. La sensibilité de la réaction a été évaluée en utilisant le superoxyde dismutase (SOD) des érythrocytes bovins (330 U/mL). L'activité inhibitrice de la réduction du cytochrome c par les extraits de *P. argentea* a été exprimée en pourcentage d'inhibition (I %) calculé ainsi:

$$I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C : absorbance en absence de l'extrait (contrôle négatif)

A_E : absorbance en présence de l'extrait

L' IC_{50} de chaque extrait (concentration inhibitrice de la réduction de 50 % du cytochrome c) a été par la suite calculée à partir de l'équation qui détermine le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait.

2.5.3. Activité anti-radicalaire (scavenger) sur le radical DPPH

L'activité anti-radicalaire des différents extraits de *P. argentea* a été évaluée par le test de DPPH (Boumerfeg *et al.*, 2012) avec de légères modifications. Cette méthode permet de suivre spectrophotométriquement la cinétique de décoloration de radical DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette à 517 nm. Pour cela, 50 µL de chacune des différentes concentrations des extraits ont été incubés avec 5 mL d'une solution méthanolique de DPPH à 0.004 %. Après une période d'incubation de 30 min, les absorbances à 517 nm ont été enregistrées. Le BHT, la rutine, la quercétine, et l'acide gallique ont été utilisés comme antioxydants de référence. Le pourcentage d'inhibition (I %) du radical DPPH par les extraits de *P. argentea* a été calculé comme suit:

$$I \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C: absorbance en absence de l'échantillon (contrôle négatif)

A_E: absorbance en présence de l'échantillon

La concentration inhibitrice de 50 % du DPPH (IC₅₀) de chaque extrait a été par la suite calculée et exprimée en µg/mL et comparée avec celles des antioxydants de référence.

2.5.4. Test de β-carotène/acide linoléique

L'activité antioxydante des extraits de *P. argentea* a été étudiée par le test de β-carotène/acide linoléique. Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à inhiber la formation des hydroperoxydes diene conjugués durant l'oxydation de l'acide linoléique (Barriere *et al.*, 2001; Aslan *et al.*, 2006). Une solution de β-carotène/acide linoléique a été préparée comme suit: premièrement, 0.5 mg de β-carotène a été dissous dans 1 ml de

chloroforme, ensuite 25 µL d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été évaporé à 40 °C dans un rotavapor. 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène (pendant 30 min) ont été ajoutées au mélange avec agitation vigoureuse. Le mélange réactionnel a été par la suite aliquoté (2.5 mL) dans des tubes à essai, et 350 µL de chacun des extraits préparés de *P. argentea*, de rutine ou d'acide gallique (2 mg/mL, dans l'eau distillée ou dans le méthanol) ont été ajoutés. La même procédure a été réalisée avec le BHT (2 mg/mL) comme un contrôle positif et avec le méthanol et l'eau distillée comme des contrôles négatifs. Les absorbances ont été lues à 490 nm, après 1 heure, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24h et 48 h d'incubation à température ambiante à l'obscurité. Le pourcentage de l'activité antioxydante (AA %) a été calculé ainsi:

$$AA \% = (A_E / A_C) \times 100$$

A_E : absorbance en présence de l'extrait

A_C : absorbance en présence du contrôle positif BHT

Remarque: Les valeurs de AA % prises pour la comparaison sont ceux calculées à 24 h.

2.5.5. Evaluation du pouvoir réducteur par la technique de FRAP

Le pouvoir réducteur de chaque extrait a été déterminé en utilisant la méthode de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) selon la procédure décrite initialement par Benzie et Strain (1996) et modifiée par Pulido et ses collaborateurs (2000). Cette technique permet de mesurer le pouvoir réducteur des antioxydants présents dans les extraits par leur capacité de

réduire le fer ferrique en fer ferreux, et donc la transformation du complexe tripyridyl-triazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) en ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) de couleur bleu à pH acide. Une solution du réactif FRAP a été préparée en mélangeant 10 volumes du tampon acétate (300 mM d'acétate de sodium, pH conduit à 3,6 par l'acide acétique) avec 1 volume de solution TPTZ (10 mM dans 40 mM HCl) et 1 volume de solution FeCl_3 (20 mM). 900 μL du réactif FRAP fraîchement préparé, préalablement incubé à 37 °C, sont mélangés avec 90 μL d'eau distillée et 30 μL des échantillons (les extraits de *P. argentea*, quercétine, rutine, acide gallique et acide ascorbique, avec dilutions appropriées). L'augmentation de l'absorbance à 595 nm est ensuite suivie pendant 30 minutes à 37 °C, les lectures à 4 min et à 30 min ont été sélectionnées pour le calcul des valeurs de FRAP. Les lectures sont effectuées contre l'eau distillée, et les absorbances du blanc du réactif (les 30 μL d'échantillon sont remplacés par de l'eau distillée) et du blanc des échantillons (absorbances des échantillons avec dilutions appropriée sans le réactif FRAP) sont soustraites de l'absorbance finale pour déterminer la valeur de FRAP de l'échantillon. Une courbe standard (**Figure 17**) a été préparée en utilisant différentes concentrations (100-2000 μM) de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Le paramètre EC_1 (concentration équivalente 1) est défini comme la concentration de l'antioxydant ayant une capacité réductrice du Fe^{3+} -TPTZ équivalente à celle de 1 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; c'est la concentration de l'antioxydant donnant une augmentation dans l'absorbance à 595 nm équivalente à la valeur théorique de l'absorbance donnée par une concentration de 1 mM du FeSO_4 déterminée par l'équation de régression correspondante (**Figure 17**).

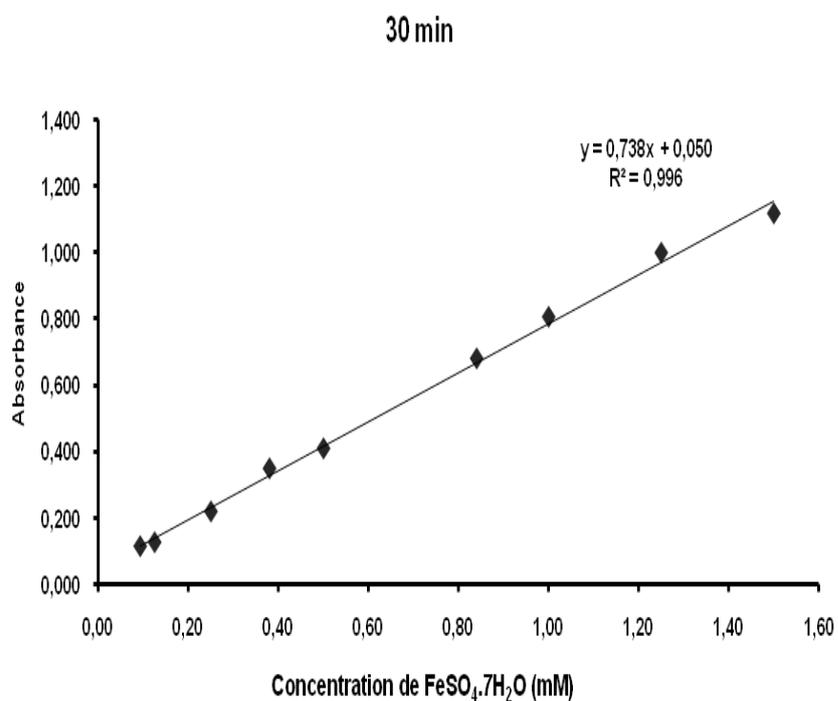
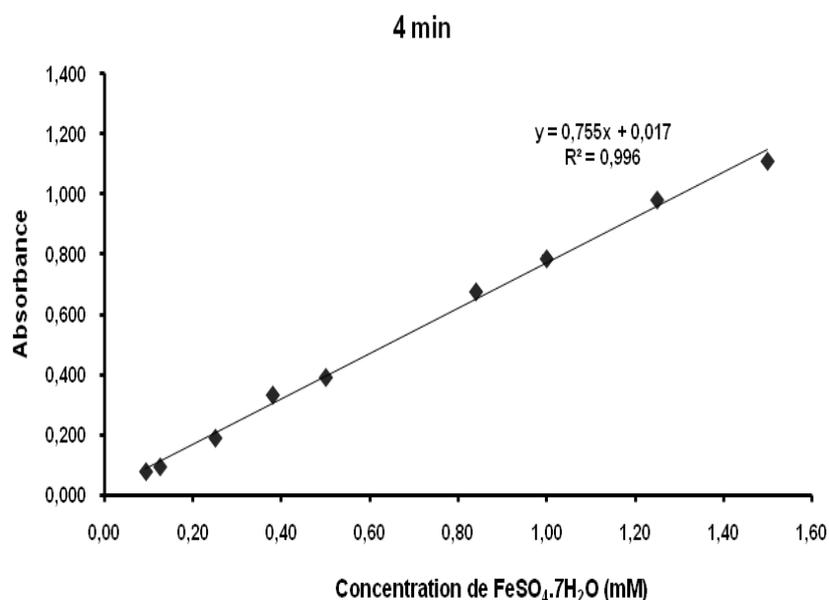


Figure 17: Courbes d'étalonnage de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 4 min et à 30 min. Les valeurs sont la moyenne de deux mesures.

2.5.6. Chélation des ions ferreux

Le test de ferrozine a été réalisé selon la méthode de Le et ses collaborateurs (2007). Ce test évalue la capacité des extraits à interagir avec le Fe^{2+} , ce qui empêche la formation du

complexe bleu-violet (Fe²⁺-ferrozine). En bref, différentes concentrations des composés testés (0.5 mL) ont été ajoutées à 0.1 mL de solution de FeCl₂ (0.6 mM dans H₂O) et 0.9 mL de méthanol. Le contrôle négatif contient tous les réactifs, à l'exception de l'extrait. Le mélange a été agité et laissé réagir à température ambiante pendant 5 min. La réaction a été initiée par l'addition de 0.1 mL de ferrozine (5 mM), et le mélange a été agité à nouveau et laissé réagir à température ambiante pendant 10 min. L'absorbance du complexe coloré (Fe²⁺-ferrozine) a été ensuite mesurée à 562 nm contre un blanc contenant tous les réactifs sauf le ferrozine. Une basse absorbance indique un grand pouvoir de chélation. L'EDTA, la quercétine et la rutine ont été utilisés comme des chélateurs de référence. Le pourcentage de l'activité chélatante (AC %) a été calculé comme suit:

$$AC \% = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

A_C: absorbance en absence de l'extrait (contrôle négatif)

A_E: absorbance en présence de l'extrait (échantillon)

Les valeurs de IC₅₀ (concentration inhibitrice de 50 % de la formation du complexe Fe²⁺-ferrozine) ont été par la suite calculées à partir de l'équation qui détermine le pourcentage de chélation en fonction de la concentration de l'extrait.

2.5.7. Activité anti-hémolytique *in-vitro* en utilisant l'AAPH

L'activité anti-hémolytique a été mesurée selon la méthode de Girard et ses collaborateurs (2006). L'AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl) a été utilisé comme un générateur de radicaux libres. L'AAPH se décompose en milieu aqueux et en présence de molécules d'oxygène, il produit les radicaux peroxy, afin de stimuler une série d'oxydation radicalaire des membranes des globules rouges. Le sang des souris utilisé dans ce test a été obtenu par décapitation (souris mâles 25 à 30 g). Le sang a été collecté dans des tubes

héparinés et centrifugé à 6000 rpm pendant 10 min, ensuite les globules rouges ont été lavés trois fois par le tampon phosphate (NaHPO₄ 10 mM, pH 7.4, NaCl 125 mM). Dans une plaque de microtitration 96 puits, 2% de la suspension d'érythrocytes (V/V dans le tampon phosphate 300 mM, pH 7.4) ont été mélangés avec 80 µL du tampon phosphate, puis 20 µL de chaque extrait de *P. argentea* ont été ajoutés à une concentration de 0.1 mg/mL. La plaque a été ensuite incubée en présence ou en absence de 136 µL d'AAPH (300 mM) à 37 °C pendant environ 4 heures et 30 min. La vitamine C a été utilisée comme antioxydant standard, et le contrôle négatif a été réalisé par l'AAPH en absence des échantillons. Le taux d'hémolyse a été déterminé par la diminution de la densité optique mesurée à 620 nm avec un lecteur de microplaques. Le pourcentage d'hémolyse (H %) a été calculé selon la relation suivante:

$$H\% = [(At_0 - At_x) / (At_0 - At_{Fin})] \times 100$$

At₀: absorbance au temps initial (0 min)

At_x: absorbance au temps x min

At_{Fin}: absorbance au temps final (270 min)

La valeur de HT₅₀ (le temps nécessaire pour résister à 50% d'hémolyse des hématies) a été par la suite calculée.

2.6. L'activité anti-inflammatoire de *P. argentea*

2.6.1 Induction de la colite expérimentale par l'acide acétique chez les souris

La colite aiguë a été induite par l'acide acétique selon la méthode de Rachmilewitz *et al.* (2002), avec de légères modifications. Brièvement, après une mise à jeun pendant 24 heures, les souris ont été légèrement anesthésiés avec de l'éther, et un cathéter métallique a ensuite été

introduit soigneusement 4 cm dans le côlon via l'anus. Un millilitre d'acide acétique (5% V/V, dans le sérum salé à 0.9%) a été instillée lentement dans la lumière du côlon. Les animaux ont ensuite maintenus dans une position de tête en bas pendant 30 s pour limiter l'expulsion de la solution. Dans les animaux témoins normaux, les souris ont reçu seulement du sérum salé à 0.9% en utilisant la même méthode.

2.6.2. Traitement des animaux

Les animaux ont été répartis en sept groupes constitués chacun de 12 animaux. Le groupe 1 normal contrôle (NC) a reçu du sérum salé à 0.9% (2 mL/kg, voie intra péritoniale) sans induction de la colite, et le groupe 2 acide acétique contrôle (AAC) a reçu du sérum salé à 0.9% (2 mL/kg, ip) 2 h après induction de la colite, les groupes 3, 4, 5 et 6 ont reçu l'extrait méthanolique de *Paronychia argentea* (EMPA) de 50, 100, 200 et 500 mg/kg respectivement 2 h après induction de la colite. Et le dernier groupe a reçu la sulfasalazine (SASP, 500 mg/kg) 2 h après induction de la colite. L'injection a été réalisée une fois par jour pendant 5 jours.

2.6.3. Sacrifice des animaux, prélèvement des échantillons et préparation des homogénats tissulaires

Dans le 6^{ème} jour, les animaux ont été anesthésiés avec de l'éther et le sang a été prélevé par une ponction rétro-orbital, pour la mesure des marqueurs de l'inflammation: Vitesse de Sédimentation des érythrocytes (VS, tube EDTA), protéine C-réactive (CRP, tube sec), et Numération-Formule Sanguine (FNS, tube EDTA). Les souris ont été ensuite sacrifiées par dislocation cervicale. Le côlon a été excisé depuis le cæcum jusqu'au rectum et séparé du tissu adipeux adhérent. Deux centimètres ont été prélevés à la partie proximale, ouverts longitudinalement, débarrassés des selles et nettoyés à l'aide du sérum salé froid, puis fixés

sur un support cartonné, et rapidement plongés dans un fixateur (formol à 10%) en vue de l'analyse histologique.

La partie restante du côlon a été ouverte longitudinalement, débarrassée des selles encore présentes et nettoyée à l'aide du sérum salé froid. Puis, ces échantillons du côlon ont été homogénéisés dans le KCl (1.15%) à raison de 10% (P/V) en utilisant un sonificateur-homogénéisateur à ultrasons. Les homogénats ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants ont été congelés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour la détermination des protéines totaux et des paramètres antioxydants (taux de MDA et de GSH, activités de la SOD et CAT).

2.6.4. Observations générales et score clinique

La quantité de l'apport alimentaire pour chaque groupe a été surveillée quotidiennement afin d'évaluer l'effet des différentes doses de l'EMPA sur la capacité de consommation de nourriture chez les souris malades. Ainsi que l'effet de cette plante sur la mobilité des souris et leur qualité du pelage a été suivi durant tous les jours du traitement en comparant avec les groupes témoins.

Le nombre de souris de chaque groupe a été comptabilisé chaque jour, et l'effet des différentes doses de l'EMPA sur la survie des souris a été déterminé en calculant le pourcentage de viabilité (V%) selon la formule suivante:

$$V\% = (N_{j_x} / N_{j_0}) \times 100$$

N_{j_x} : nombre de souris à n'importe quel jour de traitement (jour x)

N_{j_0} : nombre initial de souris (au jour 0)

La mesure du poids corporel des animaux, la consistance des selles, et le saignement rectal, pour chaque groupe ont été enregistrés quotidiennement. Le score de chaque paramètre a été déterminé selon Cooper *et al.* (1993) comme suit: variation de la perte du poids corporel (0: aucune, 1: 1-5%, 2: 5-10%, 3: 10-20%, 4: > 20%), selles hémorragique (0: négative, 2: saignement léger, 4: saignement important), et la consistance des selles (0: normal, 1 et 2: selles molles, 3 et 4: diarrhée). L'indice d'activité de la maladie (IAM) a été calculé comme la somme des trois scores précédents: la perte de poids, la consistance des selles et le saignement du côlon. Le pourcentage de perte du poids corporel (PPC%) a été calculé comme suit:

$$\text{PPC\%} = [(P_{j_0} - P_{j_x}) / P_{j_0}] \times 100$$

P_{j_0} : poids initial de la souris (au jour 0)

P_{j_x} : poids de la souris à n'importe quel jour de traitement (jour x)

2.6.5. Score macroscopique

A la fin de l'expérience, les souris ont été sacrifiées et les côlons ont été excisés. Avant la fixation et l'homogénéisation du côlon, sa longueur a été mesurée entre la jonction iléo-cæcale et le rectum proximale et son poids a ensuite été mesuré. Les côlons ont été ouverts longitudinalement et l'intensité des dommages coliques visibles ont été macroscopiquement évalués, tel que l'augmentation de la largeur du côlon et l'épaississement de sa paroi, ainsi que le score des dommages macroscopiques qui a été attribué selon les critères suivants: (0: aucun changement macroscopique, 1 et 2: érythème muqueux, érosion et ulcération légère, 3 et 4: ulcération grave, érosions sévères, œdème) (Deshmukh *et al.*, 2010).

2.6.6. Effet de *P. argentea* sur les marqueurs de l'inflammation (VS, CRP, FNS)

2.6.6.1. Effet sur les valeurs de VS

La vitesse de sédimentation (VS) reste toujours un paramètre largement utilisé pour déterminer la phase aiguë de l'inflammation (Curvers *et al.*, 2010). Le test permettant de mesurer la VS a été décrit par Westergren (1921) et Fahraeus (1921), et il est bien connu comme la méthode de Westergren. Brièvement, 0.8 mL (4 volumes) des échantillons de sang de chaque groupe de souris, prélevés dans des tubes contenant de l'EDTA (1 mg/mL de sang), ont été mélangés avec 0.2 mL (1 volume) d'une solution de citrate de sodium (3.8%). Les tubes de Westergren (pipettes graduées) ont été remplis avec le sang citraté, et placés verticalement dans des supports. La vitesse de sédimentation des érythrocytes en mm/h a été observée après 1 heure puis 2 heures de temps, ensuite la moyenne de VS 1^{ère} heure et de VS 2^{ème} heure de chaque groupe de souris ont été comparées avec celles des autres groupes.

2.6.6.2. Effet sur les valeurs de CRP

La concentration de la CRP est déterminée selon les recommandations du fabricant (SPINREACT) qui utilise la technique d'agglutination en porte (CRP-Latex), dans laquelle les particules de latex recouvertes d'anticorps anti-CRP sont agglutinées par les molécules de CRP présentes dans l'échantillon prélevé. Ce qui permet de détecter la quantité de CRP dans le sérum testé. Brièvement, 50 µL des échantillons du sérum de chaque groupe de souris ont été déposés sur les cercles des plaques-test. Une goutte (50 µL) du réactif CRP-latex a été par la suite déposée à côté de chaque goutte précédente. Chaque deux gouttes (sérum / réactif) ont été mélangées en rotation à l'aide d'une baguette, en essayant d'étendre le mélange sur toute la surface intérieure du cercle. Après agitation durant 2 min, la présence ou l'absence d'agglutination a été examinée à l'œil nu. L'absence d'agglutination montre une concentration de CRP < 6 mg/L, tandis que la présence d'agglutination indique une

concentration de CRP ≥ 6 mg/L. Dans ce cas l'échantillon a été dilué avec du serum salé (50%, 33%, 25%,...) et retesté à chaque fois jusqu'à l'obtention d'un resultat négatif (absence d'agglutination), puis la concentration de CRP [CRP] a été calculée comme suit:

$$[\text{CRP}] = 6 \times n$$

n: le nombre de dilutions

2.6.6.3. Effet sur les valeurs de FNS

Les analyses de FNS des échantillons de sang de chaque groupe de souris, prélevés dans des tubes contenant de l'EDTA (1 mg/mL de sang), ont été effectuées à l'aide d'un auto-analyseur d'hématologie (Beckman coulter), au niveau du laboratoire d'analyses médicales de l'hôpital d'El-Khroub, Constantine.

2.6.7. Effet de *P. argentea* sur les paramètres antioxydants (MDA, GSH, SOD, CAT)

2.6.7.1. Effet sur la peroxydation lipidique par le dosage du MDA dans le côlon

Le degré de la peroxydation lipidique a été évalué par la mesure du taux de malondialdéhyde (MDA) (Okhawa *et al.*, 1979). En bref, une aliquote (0.5 mL) de l'homogénat du côlon a été ajouté à 0.5 mL de TCA à 20% et 1 mL de TBA à 0.67%. Le mélange a ensuite été porté à ébullition pendant 15 min à 100 °C, puis refroidit immédiatement dans de la glace, et ajouté à 4 mL de *n*-butanol. Après centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min, l'absorbance du surnageant a été mesurée par le spectrophotomètre à 530 nm. La quantité de MDA a été calculée à partir de la courbe standard (**Figure 18**) effectuée sous les mêmes conditions avec une solution de 1,1,3,3-tetraethoxypropane (une série de dilutions à partir d'une solution mère à 10 mM), et exprimée en nmol/g de tissus colique.

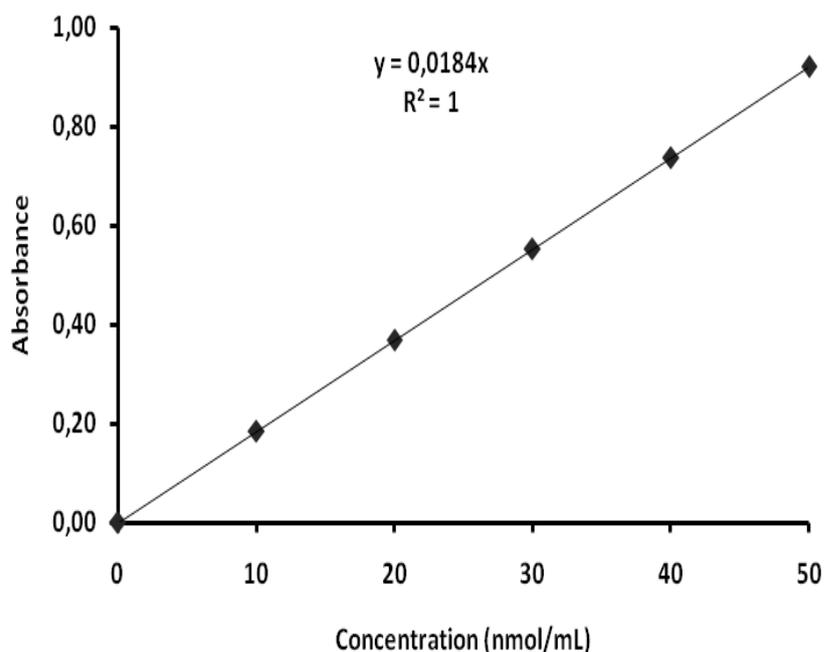


Figure 18: Courbe d'étalonnage du MDA. Les valeurs sont la moyenne de deux mesures.

2.6.7.2. Effet sur le taux de GSH dans le côlon

Le dosage du GSH du côlon a été déterminé en utilisant la méthode de Ellman (1959). Le GSH dans l'homogénat du tissu colique a été mesuré par sa réaction avec le réactif d'Ellman; le 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Pour la réaction, 0.5 mL de TCA à 10% ont été ajoutés à 0.5 mL d'homogénat du tissu colique. Le mélange a été agité de temps en temps pendant 15 minutes. Chaque échantillon a ensuite été centrifugé (2000 rpm, 5 min) et le surnageant résultant a été prélevé pour l'estimation du taux de GSH. Un volume de surnageant (0.2 mL) a été combinée avec 1.7 mL de tampon phosphate de potassium (0.1 M, pH 8), puis 0.1 mL de DTNB a été ajouté, et l'intensité de la couleur jaune résultante a été mesurée à 412 nm après 5 min d'incubation à température ambiante.

Les concentrations de GSH ont été calculées en utilisant la courbe standard de GSH (**Figure 19**) effectuée sous les mêmes conditions (une série de dilutions à partir d'une solution mère à 10 mM), et les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/g}$ de tissus colique.

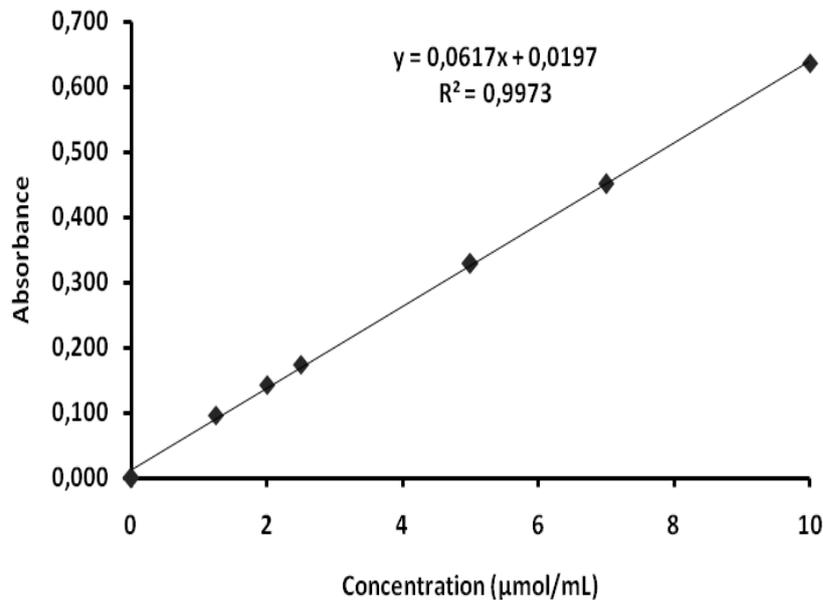


Figure 19: Courbe d'étalonnage du GSH. Les valeurs sont la moyenne de deux mesures.

2.6.7.3. Effet sur l'activité de la SOD dans le côlon

L'activité de la superoxyde dismutase a été déterminée comme il a été décrit par Misra et Fridovich (1972) avec de légères modifications. Brièvement, 0,2 mL d'homogénat de tissu colique a été ajouté à 2,5 mL de tampon carbonate (0,05 M, pH 10,2). La réaction a été déclenchée par addition de 0,3 mL d'adrénaline (0,3 mM) fraîchement préparée. Une augmentation de l'absorbance a été mesurée à 480 nm à t_0 puis toutes les 30 s pendant 150 s. Une unité de l'activité de la SOD est définie comme l'inhibition de 50 % de l'auto-oxydation de l'adrénaline en adénochrome en 1 min.

L'activité de l'enzyme a été calculée selon l'équation suivante, et les résultats sont exprimés en UI/mg de protéines:

$$\text{Activité SOD} = [(\Delta A_C - \Delta A_E) / \Delta A_C \times 100] / (n \times 50)$$

ΔA_C : différence d'absorbance dans 1 min en absence de l'homogénat (contrôle négatif)

ΔA_E : différence d'absorbance dans 1 min en présence de l'homogénat (échantillon)

n: quantité en mg de protéines dans le volume d'échantillon utilisé

2.6.7.4. Effet sur l'activité de la catalase (CAT) dans le côlon

Le dosage de l'activité de la catalase a été basé sur la capacité de la CAT de provoquer la disparition du H₂O₂ selon la méthode décrite par Claiborne (1985). Le mélange réactionnel contenait 50 µL d'homogénat et 2.95 mL de H₂O₂ (0.019 M, dans le tampon phosphate de potassium à 0.1 M, pH 7.4), et l'absorbance a été lue à 240 nm à t₀ puis après chaque 1 min pendant 2 min en utilisant un spectrophotomètre UV-visible.

L'activité de la CAT est exprimée en UI/mg protéines. Une unité de l'activité de la CAT a été calculée en utilisant la formule suivante:

$$\text{Activité CAT} = [(2.303/\Delta T) \times \log (A1/A2)] / n$$

ΔT : intervalle de temps (1 min)

A1: absorbance dans le premier temps

A2: absorbance après 1 min à partir du premier temps

n: quantité en mg de protéines dans le volume d'échantillon utilisé

- **Détermination quantitative des protéines totales dans le côlon**

La concentration en protéines dans les échantillons du côlon a été mesurée, selon les recommandations du fabricant (SPINREACT), à l'aide du réactif de biuret contenant le sulfate de cuivre (Gornall *et al.*, 1949) et en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme étalon possédant une concentration connue en protéines (7 g/dL). Les protéines donnent une couleur violette-bleue avec le sulfate de cuivre dans un milieu alcalin. En bref, 25 µL de l'homogénat du tissu colique pour chaque groupe de souris ou de l'étalon BSA ont été ajoutés à 1 mL du réactif de biuret. Le mélange a été agité puis incubé pendant 5 minutes à 37 °C. L'intensité de la coloration formée a été mesurée spectrophotométriquement à 540 nm contre un blanc contenant uniquement le réactif.

La concentration de protéines totales dans l'échantillon a été calculée selon l'équation suivante, et les résultats sont exprimés en g/dL de l'échantillon:

$$PT = (A_E / A_{BSA}) \times 7$$

A_E : absorbance en présence de l'échantillon

A_{BSA} : absorbance en présence de l'étalon BSA

7: concentration en g/dL de protéines dans l'étalon BSA

2.6.8. Analyse histologique du côlon

Pour l'examen histologique, les côlons fixés dans du formol 10% ont été déposés dans des cassettes en plastique. Puis lancés dans un automate d'infiltration tissulaire équipé par 6 bacs d'éthanol (déshydratation des échantillons car la paraffine utilisée pour l'inclusion n'est pas miscible à l'eau), 3 bacs de xylène (solvant de la paraffine pour le nettoyage et l'éclaircissement des échantillons) et 2 bacs de paraffine fondue (solidification des échantillons). Après la saturation des échantillons par la paraffine fondue, on passe à l'inclusion définitive en utilisant une station d'inclusion à la paraffine liquide dans de petits moules métalliques à fond plat qui servent à donner des blocs de paraffine solide contenant les tissus après refroidissement à -20 °C. Ensuite coupés à 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome rotatif. Les coupes réalisées sont placées dans un bain d'éthanol aqueux à 50%, puis colées sur des lames en verre dans un bain d'eau gélatineuse (liquide d'étalement), et déposées sur une plaque chauffante à 50 °C permettant le collage des coupes sur la lame. Ensuite, les lames ont été séchées dans une étuve à 37°C pendant une nuit.

Pour la coloration, les lames ont été lancées dans un automate de coloration contenant 6 bacs de xylène (déparaffinage), 4 bacs d'éthanol (réhydratation), 1 bac d'eau (rinçage), 1 bac

d'hématoxyline (coloration des noyaux en bleu), 1 bac d'eau (rinçage), 1 bac d'éosine (coloration du cytoplasme en rose), 2 bacs d'eau (rinçage), 3 bacs d'éthanol (déshydratation) et 3 bacs de xylène (éclaircissement), en restant 2 minutes dans chaque bac. Les lames ont ensuite été séchées à l'air et conservées à température ambiante. Enfin, les lames ont été lues à l'aide d'un microscope optique.

Cette étude histologique a été réalisée au niveau du laboratoire d'anatomie-pathologique du CHU de Sétif.

2.7. Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type (SD), et en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). Dans cette étude, l'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 Demo, en utilisant le test-*t* de « Student » pour la signification, et l'analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de « Dunnet » ont été effectués pour la comparaison des effets multiples des différents extraits. Les valeurs de *p* inférieure à 0.05 ont été considérées statistiquement significatives.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Extraction des composés phénoliques de *P. argentea* et dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes

L'extraction des composés phénoliques de *P. argentea* a été effectuée par des solvants organiques à partir d'une poudre végétale selon la méthode de Nana *et al.* (2011) pour obtenir l'extrait méthanolique, et la méthode de Markham (1982) pour obtenir les fractions de cet extrait.

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale a montré que l'EAq et l'EBr représentent les rendements les plus élevés (11.27 ± 1.83 % et 10.97 ± 0.63 %, respectivement), tandis que les autres extraits (EAc, EHx et ECh) affichent des rendements plus faibles qui sont de 14, 35 et 52 fois respectivement inférieurs à celui de l'EBr (**Tableau 3**).

Selon Markham (1982), les composés que pourraient contenir les différents extraits préparés seraient comme suit: l'extrait méthanolique brut peut contenir des flavonoïdes, des aminoacides, des terpènes, des cires et des tannins, suivi de l'extrait d'hexane qui est en générale constitué de lipides et de flavonoïdes aglycones hautement méthoxylés, ensuite l'extrait du chloroforme qui est plus riche en flavonoïdes aglycones, puis l'extrait d'acétate d'éthyle qui contient les flavonoïdes glycosylés en particulier mono, di et tri-glycosylés et enfin l'extrait aqueux qui peut être constitué des flavonoïdes les plus polaires (di, tri et tetra-glycosylés).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta *et al.*, 2005). Et comme la majorité des effets pharmacologiques des plantes est dû à ces substances, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des trois extraits (EBr, ECh et EAc) de *P. argentea* a été effectué.

Les polyphénols totaux dans ces extraits sont dosés selon la méthode de Folin-Ciocalteu utilisant l'acide gallique comme un composé phénolique standard. D'après les résultats présentés dans le **Tableau 3**, l'EAc est le plus riche en polyphénols (525.79 ± 0.79 mg EAG/g E), par contre l'EBr et l'ECh contiennent presque la moitié de cette quantité de polyphénols. La détermination des taux des flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium révèle que l'EAc représente également la fraction la plus riche en flavonoïdes avec une teneur (194.19 ± 8.62 mg EQ / g E) presque 5 et 15 fois supérieur à celles trouvées dans l'ECh et l'EBr, respectivement (**Tableau 3**). Si les calculs sont effectués à partir de la courbe d'étalonnage de la rutine, la concentration des flavonoïdes dans ces extraits est doublée (**Tableau 3**).

Tableau 3: Les rendements des extraits de *Paronychia argentea* et ses teneurs en polyphénols totaux et en flavonides.

Les extraits	Rendement (%)	Polyphénols totaux (mgEAG/g E)	Flavonoïdes	
			mg EQ / g E	mg ER / g E
EBr	10.971 ± 0.637	217.463 ± 0.87	13.349 ± 0.562	26.765 ± 0.837
EHx	0.314 ± 0.097	nd	nd	nd
ECh	0.212 ± 0.015	211.444 ± 0.778	38.621 ± 1.303	87.717 ± 1.811
EAc	0.786 ± 0.175	525.796 ± 0.796	194.193 ± 8.622	382.176 ± 4.74
EAq	11.271 ± 1.831	nd	nd	nd

nd : non déterminé. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n = 3).

2. Purification, contrôle de pureté et estimation de l'activité enzymatique de la xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) a été purifiée à partir du lait bovin frais selon la procédure décrite par Baghiani *et al.* (2003), par une série de centrifugation puis précipitation au sulfate d'ammonium, suivie d'une séparation par chromatographie d'affinité sur colonne (héparine-agarose). Le lait bovin a abouti environ 23.21 mg de XOR par litre, ce qui est comparable à la quantité (20.32 mg/mL) déclarée par Baghiani *et al.* (2003).

La pureté de l'enzyme a été estimée par la détermination de la valeur du PFR, et confirmée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE). La XOR fraîchement purifiée présente un spectre d'absorption ultraviolet-visible (UV-Vis) avec trois pics majeurs à 280, 325, 450 nm (**Figure 20a**), avec un rapport A280/A450 (rapport protéine/flavine, PFR) de 5.15, ce qui indique un degré de pureté élevé (Bray, 1975). Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (Benboubetra *et al.*, 2004; Baghiani *et al.*, 2011). L'enzyme purifiée a montré une seule bande principale (**Figure 20b**) d'approximativement 150 kDa de poids moléculaire après une SDS-PAGE, ce qui est comparable aux résultats rapportés par Baghiani *et al.* (2003), Atmani *et al.* (2004) et Baghiani *et al.* (2011).

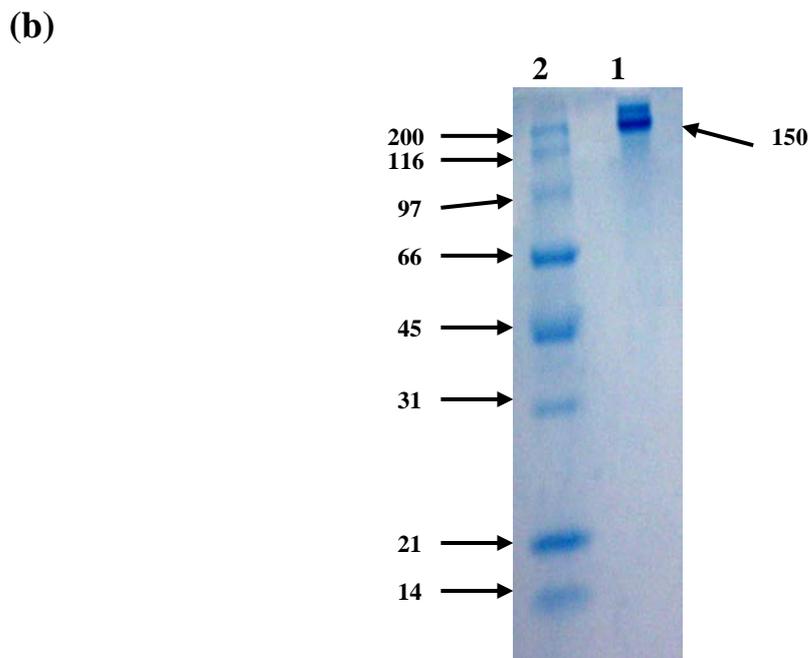
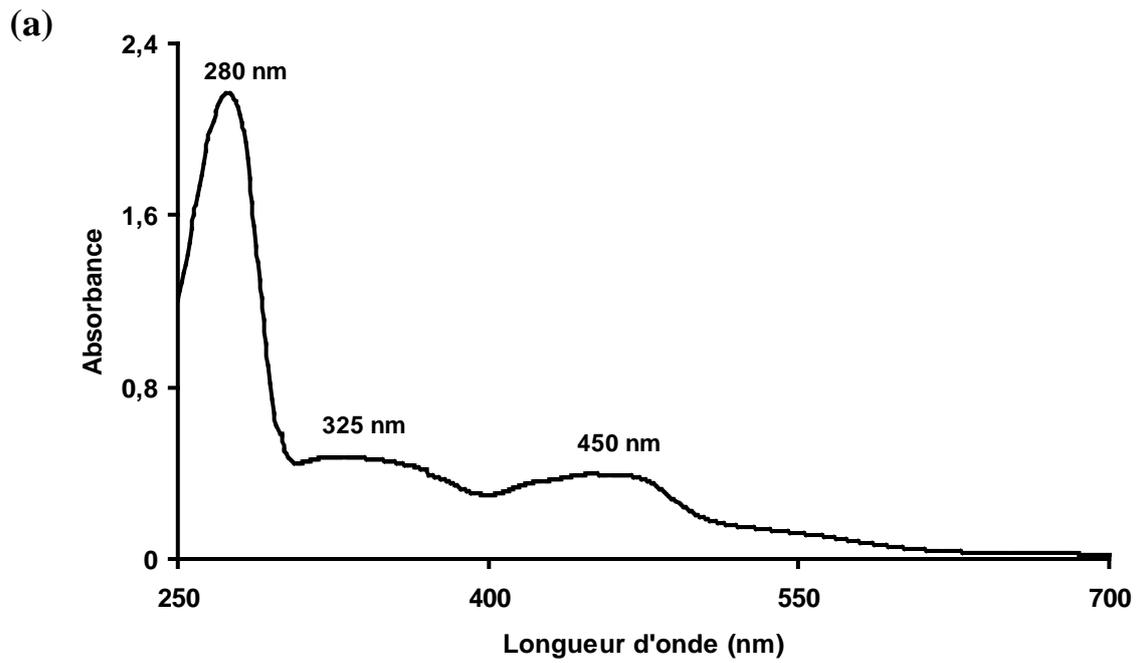


Figure 20: Spectre d'absorption UV-Vis (a) et électrophorèse (SDS-PAGE) (b) de la XO purifiée. (1): XO pure (150 000 Da), (2): Standards des poids moléculaires (Myosin 200 000; β -galactosidase 116 000; Phosphorylase b 97 400; Serum albumin 66 000; Ovalbumin 45 000; Carbonic anhydrase 31 000, Trypsin inhibitor 21 500 et Lysozyme 14 000 Da).

L'activité totale de la XOR (**Tableau 4**) a été estimée en présence de xanthine comme un substrat donneur d'électrons et de NAD⁺ comme un accepteur d'électrons, et l'activité de la forme oxydase a été mesurée par la même méthode mais en absence de NAD⁺, et le pourcentage de la forme oxydase a été par la suite calculé. La forme oxydase de l'enzyme purifiée a montré une activité de 1988.55 nmol / min / mg de protéine, et l'enzyme obtenue est en grande partie (plus de 90%) sous la forme oxydase (**Tableau 4**). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Baghiani *et al.* (2003; 2012).

Tableau 4: Purification de la xanthine oxydoréductase (XOR) à partir du lait bovin frais.

Activité (nmol/min/mg protéine)*		Pourcentage de la forme oxydase (XO) (%)	Rapport Protéine/Flavine (PFR)
Totale (XDH+XO)	Forme oxydase (XO)		
2055.05	1988.55	91.89	5.15

* L'activité totale et l'activité de la forme oxydase ont été calculées en suivant la production de l'acide urique en présence et en absence de 500 µM de NAD⁺ respectivement, et 100 µM de xanthine dans un tampon Na-bicine à pH 8.3.

3. L'activité antioxydante des extraits de *P. argentea* en utilisant des tests *in-vitro*

3.1. Effet inhibiteur de l'activité de la xanthine oxydase

L'effet des extraits de *P. argentea* sur la conversion métabolique de la xanthine en acide urique a été étudié. Les résultats démontrent que tous les extraits ont exercé une inhibition de l'activité de la XO très significative ($p < 0.0001$) et d'une manière concentration-dépendante (**Figure 21**).

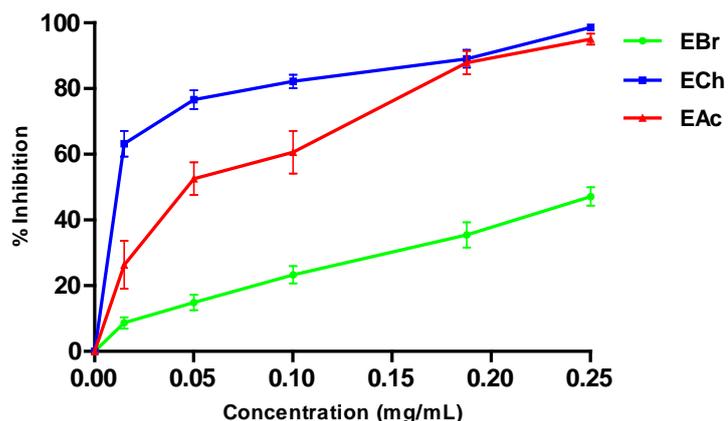


Figure 21: Effet inhibiteur des extraits de *P. argentea* sur l'activité de la XO. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3).

Les valeurs de IC_{50} des différents extraits (**Figure 22**) montrent que l'ECh semble avoir l'effet inhibiteur le plus puissant, parmi les trois extraits, avec une IC_{50} de 0.013 ± 0.00008 mg/mL, suivi par l'EAc et l'EBr respectivement. D'autre part, l'ECh et l'EAc ont un effet presque 3 et 10 fois respectivement inférieur à celui de l'allopurinol, alors que l'EBr est presque 65 fois plus faible. La présence des polyphénols et des flavonoïdes dans l'extrait contribue à l'inhibition de la xanthine oxydase (Abdullahi *et al.*, 2012; Kilani-Jaziri *et al.*, 2014). Donc, l'effet inhibiteur le plus élevé de l'extrait d'acétate d'éthyle et du chloroforme par rapport à celui de l'extrait brut est dû à leur richesse en polyphénols et en flavonoïdes.

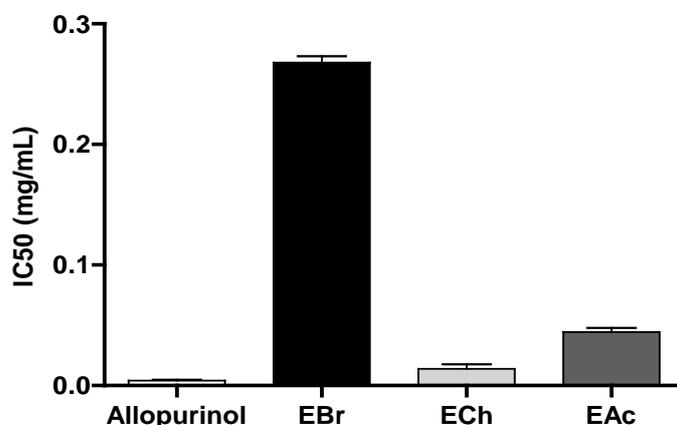


Figure 22: Les concentrations des extraits de *P. argentea* et de l'allopurinol qui inhibent 50% de l'activité de la XO. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

En plus du facteur quantitatif, la qualité des flavonoïdes présents dans chaque extrait peut déterminer l'effet inhibiteur. Cos et ses collaborateurs (1998) ont déterminé la relation entre la structure chimique des flavonoïdes et leurs activités inhibitrices de la XO. Ils ont montré que la présence de la double liaison entre les carbones C2 et C3 et l'absence du groupement hydroxyle en C3 des flavonoïdes augmentent leur activité inhibitrice. Ils ont aussi montré que les flavonoïdes glycosylés ont des activités inférieures à celles des flavonoïdes non glycosylés; par exemple, la rutine est presque dix fois moins active que la quercétine. Donc la richesse de l'ECh de *P. argentea* en flavonoïdes aglycones pourrait être à l'origine de son effet inhibiteur le plus puissant. Ces résultats sont relativement en accord avec ceux de Baghiani *et al.* (2010; 2012) dans leurs études sur les plantes *Capparis spinosa* et *Carthamus caeruleus* respectivement, où l'ECh et l'EAc ont un effet inhibiteur plus puissant que l'EBr.

Comme la XO joue un rôle critique dans l'hyperuricémie et la goutte, ainsi que dans les maladies cardiovasculaires, les inhibiteurs de la XO sont considérés comme des médicaments efficaces pour contrôler ces problèmes de santé liés à l'acide urique (Lu *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Bien que l'allopurinol est le médicament le plus couramment utilisé comme un inhibiteur de la XO, on estime qu'environ 5% des patients sont incapables de tolérer ses effets indésirables, ceux-ci comprennent l'irritation gastro-intestinale, la suppression de la moelle osseuse, la fièvre, la détérioration de la fonction rénale et les syndromes d'hypersensibilité allant de la simple éruption cutanée à des conditions menaçant la vie dans lesquelles les patients développent une nécrolyse épidermique toxique (Lin *et al.*, 2014). Donc, en raison des limitations des médicaments disponibles inhibiteurs de la XO, le développement de nouveaux médicaments avec une activité thérapeutique accrue et moins d'effets secondaires est un domaine de recherche très actif (Lu *et al.*, 2013). Par conséquent, les extraits de *P. argentea* qui sont des inhibiteurs très puissants de la XO, peuvent être utilisés comme traitement des maladies liées à cette enzyme.

3.2. Effet scavenger sur le radical superoxyde produit par la XO

En prenant en compte que l'effet inhibiteur sur l'enzyme XO elle-même conduit également à une diminution de la réduction du cyt c (Valentao *et al.*, 2001), la capacité des différents extraits de *P. argentea* à piéger les radicaux superoxydes a été déterminé en suivant la réduction du cytochrome c^{+3} (cyt c^{+3}) à 550 nm selon la procédure développée par Robak et Gryglewski (1988). Les résultats ont montré que tous les extraits de *P. argentea* inhibent la réduction du cyt c de façon significative et d'une manière dose-dépendante ($p < 0.0001$) (Figure 23).

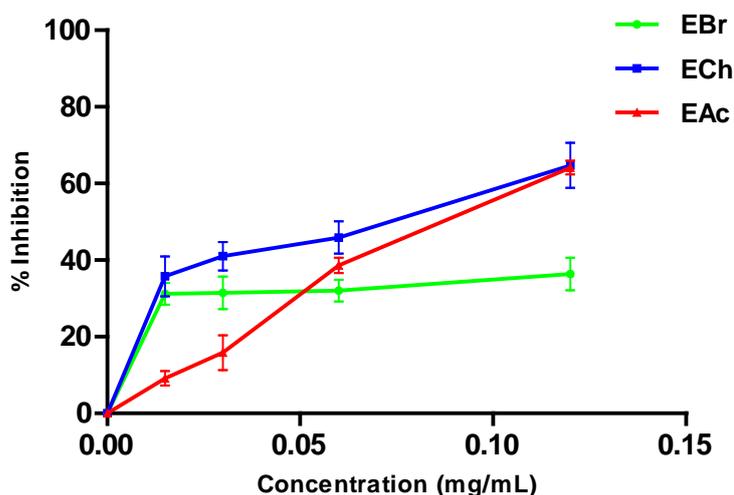


Figure 23: Effet inhibiteur de la réduction du cyt c par l' $O_2^{\bullet-}$ produit par la XO des extraits de *P. argentea*. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3).

Les résultats des IC_{50} des trois extraits de *P. argentea* sont représentés dans la Figure 24. En faisant une comparaison entre ces extraits, l'ECh a la capacité la plus forte à inhiber la réduction du cyt c par l' $O_2^{\bullet-}$ produit par la XO avec une $IC_{50} = 0.092 \pm 0.00014$ mg/mL, suivi par l'EAc et l'EBr. Dans cette l'étude la SOD (330 U/mL), qui a été utiliser comme standard piègeur du radical superoxyde, a totalement inhibé la réduction du cyt c.

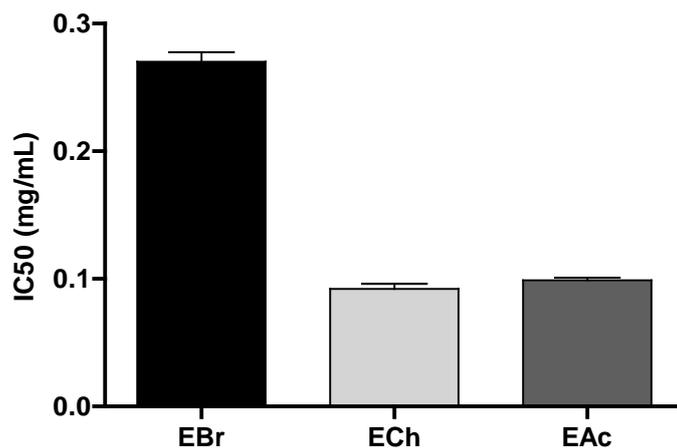


Figure 24: Les concentrations des extraits de *P. argentea* qui inhibent la réduction de 50% du cyt c par le superoxyde produit par la XO (effet scavenger). Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques sont directement liées à leurs structures. La présence des groupements hydroxyles et des doubles liaisons carbone-carbone dans certaines positions améliore leur effet scavenger (Cos *et al.*, 1998; Dugas *et al.*, 2000; Balan *et al.*, 2014). Ainsi, il est possible que les propriétés antioxydantes des extraits de *P. argentea* sont causées par la présence des polyphénols et des flavonoïdes.

L'inhibition de la réduction du cyt c est dû à l'effet inhibiteur de la XO et/ou l'effet scavenger de $O_2^{\bullet-}$ produit par cette enzyme (Valentao *et al.*, 2002). Cos et ses collègues (1998) ont montré que si les valeurs de IC₅₀ pour l'effet scavenger sur l' $O_2^{\bullet-}$ sont inférieures à celles de l'inhibition de la production d'acide urique, cela indique que les extraits ont un effet inhibiteur de l'activité de la XO avec un effet scavenger supplémentaire sur le radical $O_2^{\bullet-}$. Dans notre étude, l'ECh et l'EAc présentent des valeurs de IC₅₀ de la réduction du cyt c supérieures à ceux de l'inhibition de la XO (**Figure 25**), donc l'inhibition de la réduction du cyt c par ces extraits est due à l'effet inhibiteur de la XO et à un effet scavenger très faible sur le $O_2^{\bullet-}$. Alors que l'EBr a une IC₅₀ de la réduction du cyt c à peu près identique à celle de l'inhibition de la XO (**Figure 25**); par conséquent, il est considéré comme antioxydant

uniquement en raison de sa capacité à inhiber la XO mais pas en tant que piègeur des radicaux superoxydes.

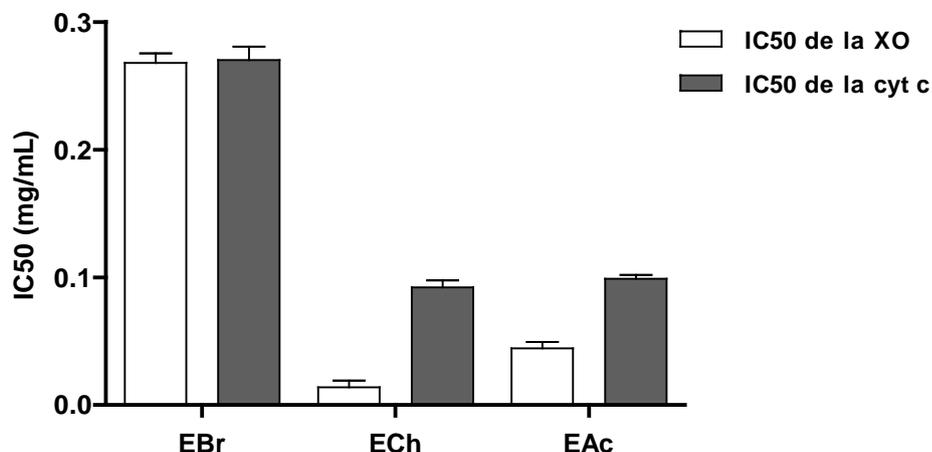


Figure 25: Les concentrations des extraits de *Paronychia argentea* qui inhibent 50% de l'activité de la XO en comparaison avec celles qui inhibent la réduction de 50% du cyt c par l' $O_2^{\bullet-}$ produit par cette enzyme. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 3).

3.3. Activité anti-radicalaire (scavenger) sur le radical DPPH

Le DPPH a été largement utilisé comme un radical libre pour étudier la capacité des extraits des plantes d'agir comme piègeurs de radicaux libres (Khled-Khodja *et al.*, 2014). En général, les antioxydants réagissent avec le DPPH (2,2'-diphényl-1-picryle hydrazyle), qui est un radical de couleur violette foncée et avec une absorption caractéristique à 517 nm, et le convertir en 2,2'-diphényl-1-picryle hydrazine (de couleur jaune), cette propriété est due à la capacité de l'antioxydant à donner les atomes d'hydrogène en rythme très rapide (**Figure 26**) (Hajlaoui *et al.*, 2010; Sethiya *et al.*, 2014).

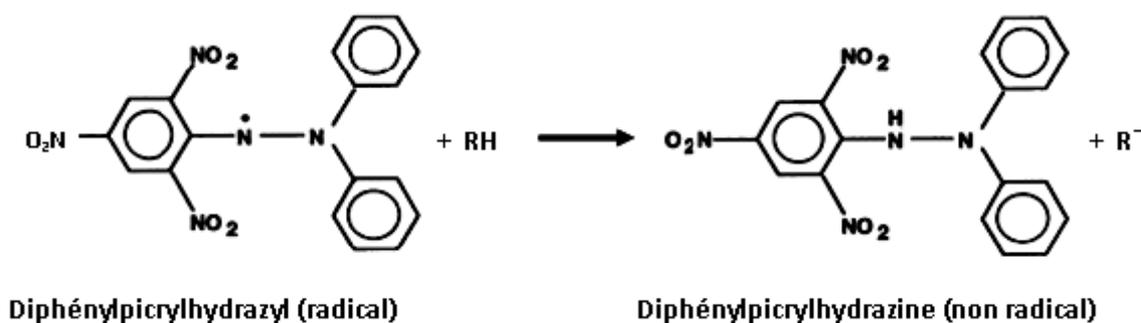


Figure 26: La réduction du DPPH par un antioxydant, d'après Molyneux (2004).

La capacité de don d'hydrogène des trois extraits de *P. argentea* a été mesurée à partir de la décoloration de la solution méthanolique du DPPH. Le degré du changement de couleur indique le potentiel de piégeage de nos extraits. Les résultats ont montré que ces extraits présentent un effet scavenger très significatif ($p < 0.0001$) sur le radical DPPH et d'une manière dose-dépendante, comme le montre la **Figure 27**.

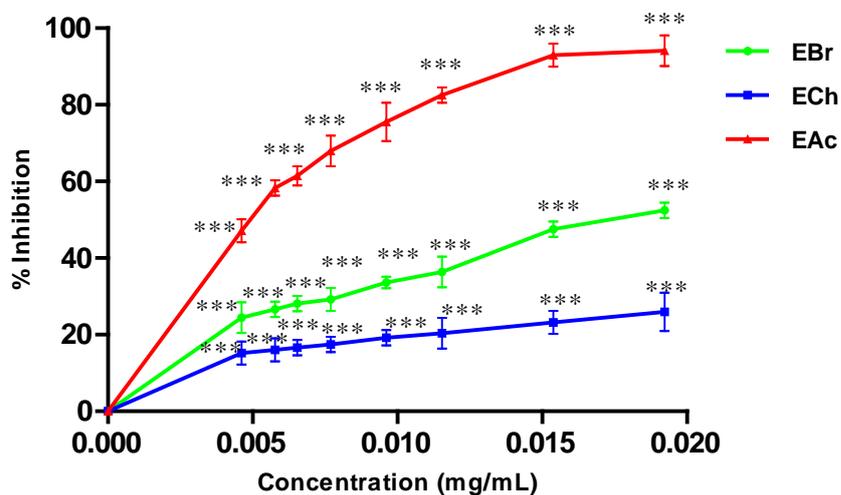


Figure 27: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en présence de différentes concentrations des extraits de *P. argentea* (effet scavenger). Chaque point représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). *** $p < 0.0001$, comparant avec le contrôle en absence des extraits.

La valeur d'IC₅₀ la plus faible indique l'effet scavenger le plus fort. Donc, basant sur les valeurs calculées de IC₅₀ présentées dans la **Figure 28**, l'ordre de l'effet scavenger sur le radical DPPH est comme suit: ECh < EBr < EAc. Comparant avec le BHT (IC₅₀ = 20.717 ± 0.162 µg/mL), l'EAc et l'EBr sont plus efficaces ($p < 0.0001$). Les composés phénoliques de référence (acide gallique, quercétine et rutine) possèdent une activité anti-radicalaire très élevée et supérieure à celle du BHT, dont le plus actif est l'acide gallique avec une IC₅₀ de 0.59 ± 0.01 µg/mL, ensuite la quercétine et la rutine. Par contre, l'ECh qui est plus riche en flavonoïdes que l'EBr, représente l'effet scavenger le plus faible (**Figure 28**).

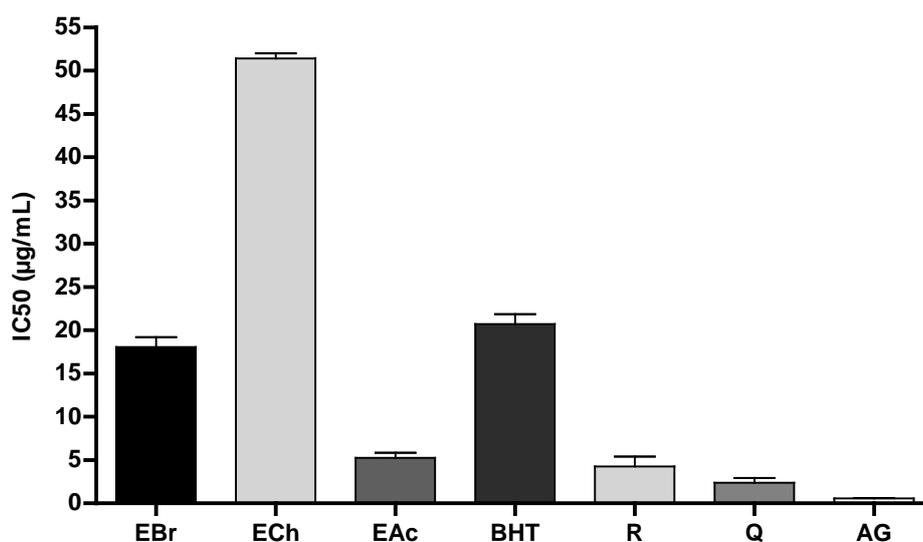


Figure 28: Les concentrations des extraits de *P. argentea* et des standards qui inhibent 50% du radical DPPH (effet scavenger). (BHT, R: rutin, Q: quercétine et AG: acide gallique). Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3).

D'après les résultats, l'extrait qui présente une forte activité antioxydante possède une teneur élevée en polyphénols. Il a été prouvé que les composés phénoliques présents dans les plantes sont principalement responsables de l'effet scavenger des radicaux libres (Amessis-

Ouchemoukh *et al.*, 2014). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres chercheurs (Custódio *et al.*, 2015) qui ont rapporté une corrélation significative entre la teneur en polyphénols totaux et l'effet scavenger des extraits de *Quercus suber* sur le radical DPPH. D'autre part, malgré qu'il n'y a pas une grande différence entre le contenu en polyphénols de l'EBr et de l'ECh, mais l'EBr présente un effet antiradicalaire plus élevé que celui de l'ECh, cela peut être dû à la nature des composés phénoliques ou d'autres produits présents dans l'EBr.

3.4. Test de β -carotène / acide linoléique

Dans ce système, les radicaux libres produits par l'oxydation de l'acide linoléique, provoquent l'oxydation du β -carotène hautement insaturées ce qui conduit à sa décoloration, (Prior *et al.*, 2005). La présence des antioxydants dans l'extrait minimise l'oxydation du β -carotène et conserve sa couleur (Tepe *et al.*, 2005). Les résultats des pourcentages de l'activité antioxydante en fonction du temps sont représentés dans la **Figure 29**. Ces résultats montrent que tous les extraits de *P. argentea* inhibent l'oxydation du β -carotène de façon très significative ($p < 0.0001$) durant les 48 heures de l'expérience, et que l'activité antioxydante de ces extraits est plus élevée que celle des antioxydants standards rutine et acide gallique.

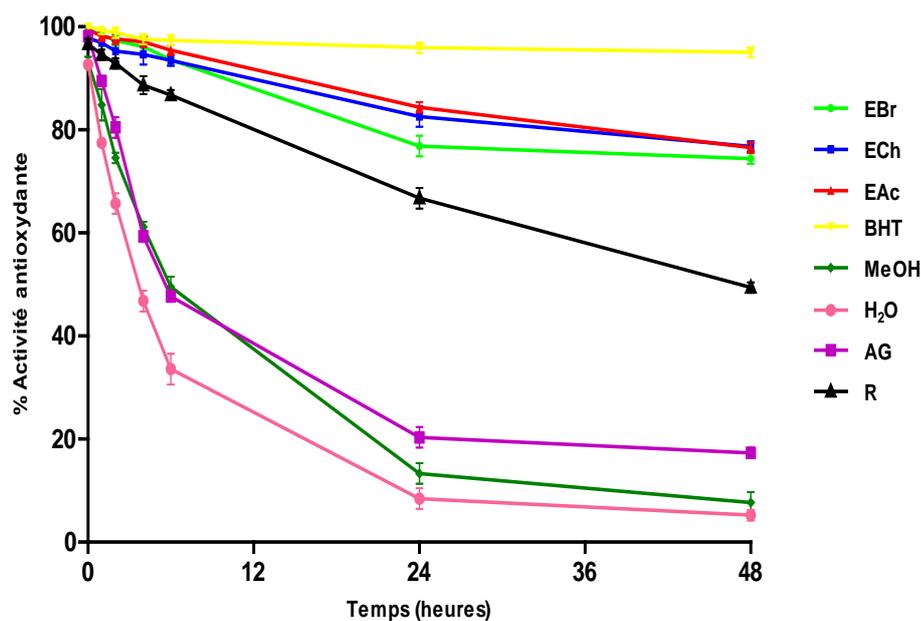


Figure 29: Activité antioxydante des extraits de *P. argentea*, des antioxydants standards (BHT, R: rutine, AG: acide gallique) et des blancs (MeOH: méthanol, et H₂O) par le test de β -carotène / acide linoléique pendant 48 heures. Chaque point représente la moyenne \pm SEM (n = 3).

L'EAc et l'ECh ont présenté les pourcentages d'inhibition de l'oxydation du β -carotène les plus élevés (84.36 ± 0.33 % et 82.60 ± 0.51 %, respectivement), et ces valeurs ne sont pas loins de celle du BHT (95.94 ± 0.019 %), après 24 heures d'incubation. Tandis que l'EBr a montré une valeur relativement inférieure à celles des deux autres extraits (**Figure 30**). Dans le test de blanchiment du β -carotène, l'acide linoléique produit des hydroperoxydes comme des radicaux libres au cours de l'incubation, les antioxydants présents dans les extraits peuvent arrêter l'oxydation et le blanchiment du β -carotène par neutralisation de ces hydroperoxydes et d'autres radicaux libres formés dans le système (Jayaprakasha *et al.*, 2001; Tepe *et al.*, 2005; Baghiani *et al.*, 2012). Selon Ourique da Silva et ses collaborateurs (2015), cet effet est dû soit à la neutralisation des radicaux libres (hydroperoxydes) produits au cours de la peroxydation de l'acide linoléique (effet scavenger), ou à l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique, ce qui donc détermine la capacité de ces extraits à inhiber la peroxydation des lipides.

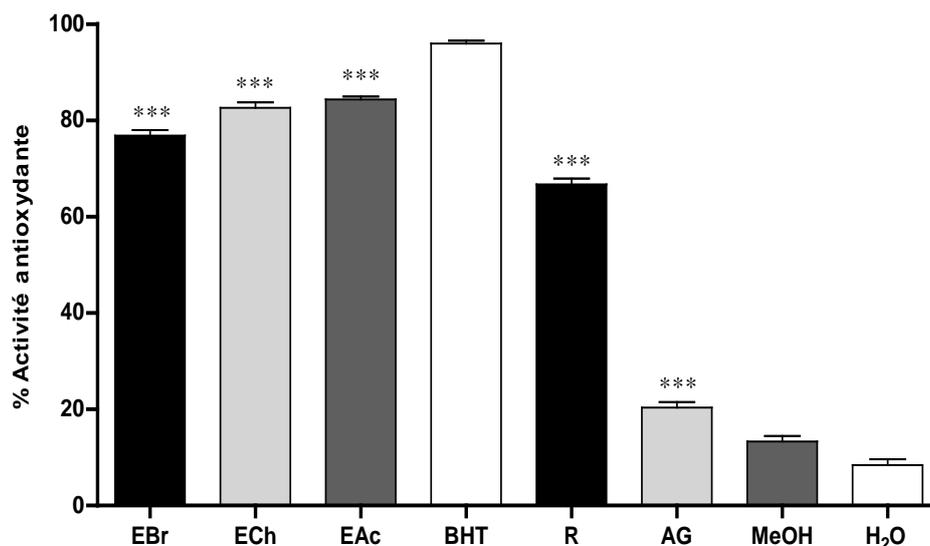


Figure 30: Activité antioxydante (à 24 h) des extraits de *P. argentea*, des antioxydants standards (BHT, R: rutine, AG: acide gallique) et des blancs (MeOH: méthanol, et H₂O) par le test de β -carotène / acide linoléique. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n = 3). *** $p < 0.0001$, comparant avec le contrôle en absence des extraits (les blancs).

Sethiya et ses collègues (2014) ont montré que l'activité antioxydante des extraits des plantes est due à leurs teneurs en polyphénols et en flavonoïdes. D'autre part, les résultats obtenus par Amessis-Ouchemoukh et ses collaborateurs (2014) indiquent que les antioxydants lipophiles sont plus importants, car ils sont solubles dans les lipides, inhibant ainsi la formation des radicaux lipidiques et empêchant l'oxydation du β -carotène. Dans notre étude, les extraits les plus riches en polyphénols sont l'EAc et l'ECh, donc il ya une bonne corrélation entre leur activité antioxydante et le contenu en polyphénols.

3.5. Evaluation du pouvoir réducteur par la technique de FRAP

La méthode de FRAP est basée sur la réduction du complexe tripyridyltriazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) à la forme colorée tripyridyltriazine ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) à faible pH (Routray et Orsat, 2014). Dans l'étude présente, on a observé que la réduction du complexe TPTZ-ferrique n'est pas complète après 4 min et la plupart des composés montrent une

augmentation constante de l'absorbance en fonction du temps, donc on a prolongé le temps de réaction à 30 min. Comme le montre la **Figure 31**, tous les extraits ont doublé leurs absorbances après 30 min de réaction. Ces augmentations des absorbances ne sont pas causées par des altérations du mélange réactionnel en fonction du temps, parce que les échantillons blancs n'ont montré aucune modification significative de leur absorbance initiale. Le test de FRAP est basé sur l'hypothèse que l'oxydoréduction procède si rapidement que toutes les réactions sont terminées en moins de 4 et 6 minutes, mais en pratique, cela n'est pas toujours le cas (Ou *et al.*, 2002). Bolling et ses collègues (2010) ont mesuré le pouvoir réducteur du fer ferrique des extraits des amandes de la Californie, l'absorbance a été augmentée lentement, même après 1 heure de temps de réaction.

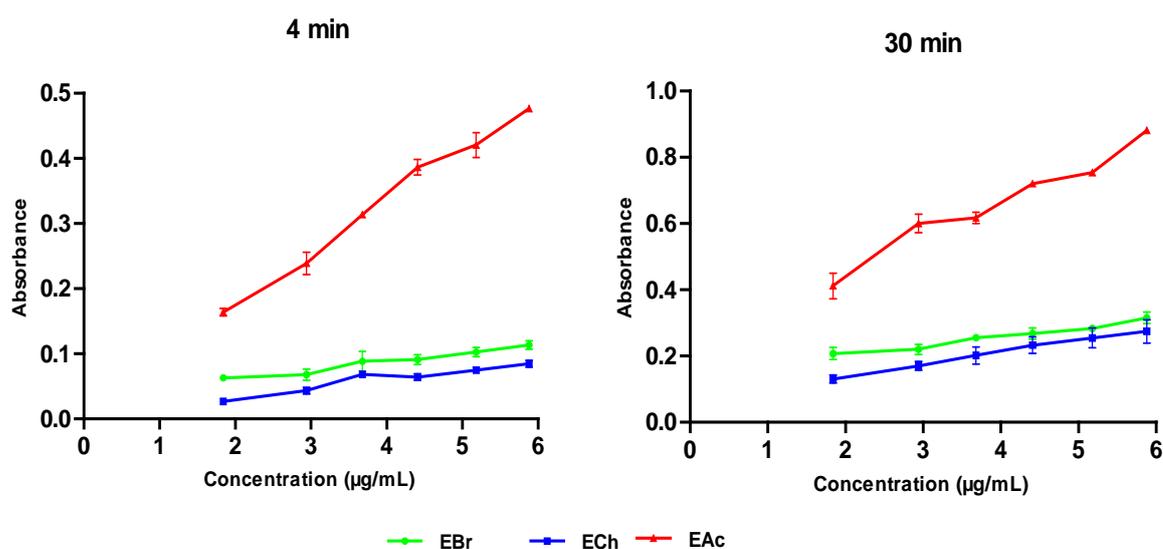


Figure 31: Cinétique de la réduction du Fe^{3+} -TPTZ en Fe^{2+} -TPTZ par les extraits de *P. argentea* à 4 min et à 30 min. Chaque point représente la moyenne \pm SD ($n = 2$).

La concentration équivalente 1 ou EC_1 , calculée dans cette étude, est la concentration de l'antioxydant ayant une capacité réductrice du TPTZ ferrique équivalente à celle du $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à 1 mM. Les valeurs d' EC_1 faibles montrent le pouvoir réducteur élevé. Toutes les valeurs d' EC_1 à 4 min sont inférieures à celles à 30 min (**Figure 32**). Par conséquent la

capacité réductrice est faible à de plus longues durées de réaction. Que ce soit à 4 min ou à 30 min, tous les extraits de *P. argentea* présentent un pouvoir réducteur supérieur à celui des standards utilisés: acide gallique, quercétine, rutine et acide ascorbique ($p < 0.0001$). Malgré que le pouvoir réducteur le plus faible des extraits de cette plante a été observé pour l'ECh avec une EC_1 (g/L) de $(0.055 \pm 0.0004$ et $0.029 \pm 0.0004)$ à 4 min et 30 min, respectivement (**Figure 32**), cet extrait présente la capacité réductrice la plus forte en comparant avec les antioxydants standards utilisés. Ces résultats ont démontré que les extraits de *P. argentea* possèdent un pouvoir réducteur très puissant.

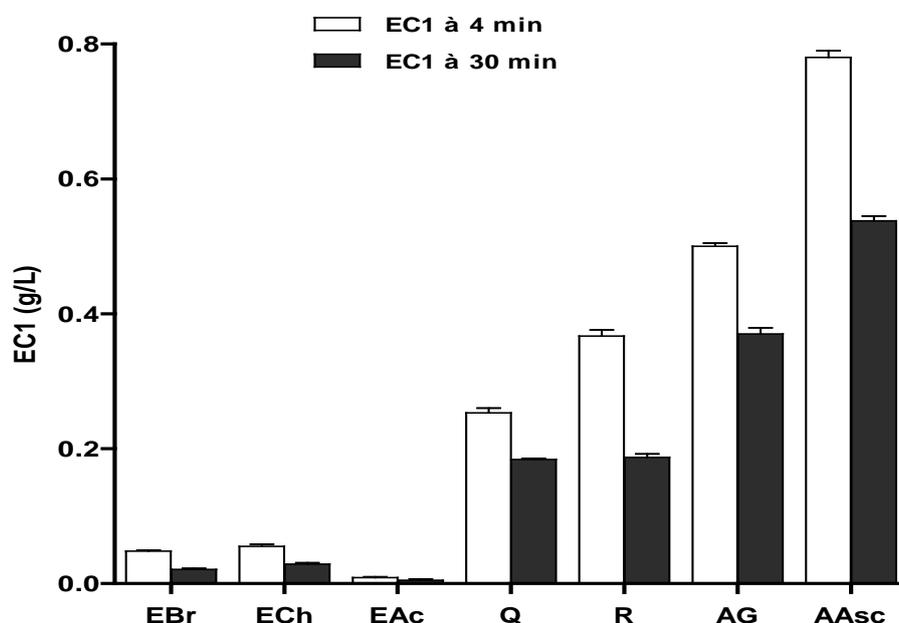


Figure 32: Les valeurs de EC_1 à 4 min et à 30 min des extraits de *Paronychia argentea* et des antioxydants standards (Q: quercétine, R: rutine, AG: acide gallique et AAsc: acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n = 3$)).

Nos résultats ont révélé une grande corrélation entre le pouvoir réducteur et la teneur en polyphénols, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Tan et Chan (2014), qui ont travaillé sur les feuilles de *Anacardium occidentale* (noix de cajou) et *Piper betle* (bétel). Dans notre étude, la quercétine a montré la valeur de EC_1 la plus faible par rapport aux autres

antioxydants standards, suivie par la rutine ensuite l'acide gallique. Alors que l'acide ascorbique a le pouvoir réducteur le plus faible, ces résultats sont en accord avec les résultats de Baghiani *et al.* (2011) et Boumerfeg *et al.* (2012). De plus, l'ordre de ces composés standards utilisés en fonction de leur capacité réductrice rapportée dans notre étude est en accord avec les résultats rapportés par Abdelwahab et ses collaborateurs (2014) qui ont travaillé sur les huiles essentielles de *Cinnamomum altissimum*, mais il ne diffère que dans de l'acide gallique, qui a présenté le pouvoir réducteur le plus élevé, suivi par la quercétine puis la rutine et finalement l'acide ascorbique.

3.6. Chélation des ions ferreux

Le ferrozine, un réactif chélateur, peut former un complexe violet avec le Fe^{2+} . En présence d'échantillons possédant une activité de chélation, la formation du complexe ferreux-ferrozine est perturbée, ce qui entraîne une diminution de la couleur pourpre du complexe. Par conséquent, la mesure du taux de réduction de la couleur permet d'estimer l'activité chélatante des échantillons (Ganesan *et al.*, 2011). Dans cette étude, les résultats ont montré que la formation du complexe ferrozine- Fe^{2+} est inhibée en présence de tous les extraits de *P. argentea* d'une manière dose-dépendante et très significative ($p < 0.0001$) (Figure 33).

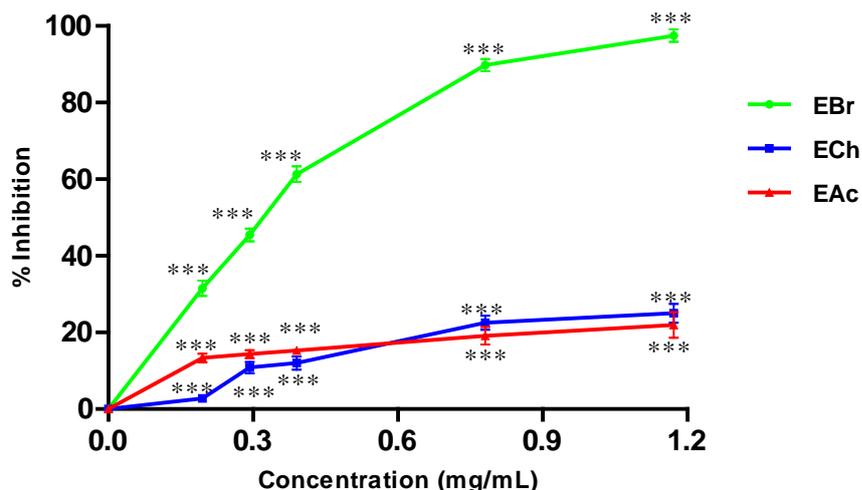


Figure 33: Pourcentage d'inhibition de la formation du complexe ferrozine-Fe²⁺ en présence de différentes concentrations des extraits de *P. argentea* (effet chélateur). Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 3). *** $p < 0.0001$, comparant avec le contrôle en absence des extraits.

L'ion ferreux (Fe²⁺) est le pro-oxydant le plus puissant parmi les différentes espèces d'ions métalliques. Il peut stimuler la peroxydation lipidique par la réaction de Fenton et accélère également la peroxydation en décomposant les hydroperoxydes lipidiques en radicaux peroxy et alcoxy, qui peuvent eux-mêmes perpétuer la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique. La capacité de chélation est très importante car elle permet de réduire la concentration des métaux de transition et conduit à arrêter la réaction de Fenton et donc la réduction de la production des radicaux hydroxyles (OH[•]) (Koheil *et al.*, 2011).

L'EBr et l'ECh de *P. argentea* ont présenté une excellente activité chélatante plus élevée que celle de la rutine ($p < 0.0001$), en particulier l'EBr qui a donné une IC₅₀ de 0.332 ± 0.001 mg/mL. Par contre, l'effet chélateur des ions ferreux le plus faible a été observé par l'EAc (**Figure 34**).

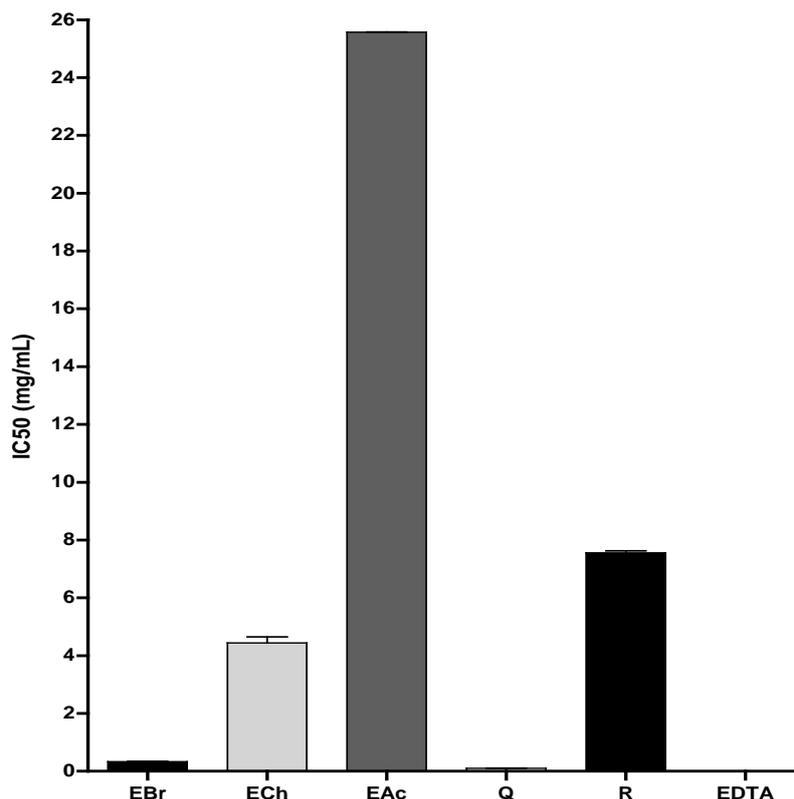


Figure 34: Les concentrations des extraits de *P. argentea* et des standards (EDTA, R: rutin, Q: quercétine) qui inhibent 50% de la formation du complexe ferrozine-Fe²⁺ (effet chélateur des ions Fe²⁺). Chaque valeur représente la moyenne ± SD (n = 3).

Ces résultats démontrent clairement la capacité des extraits de *P. argentea* à chélater l'ion ferreux. L'accumulation excessive d'ions métalliques entraîne un stress oxydatif dû à une formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène, qui sont responsables des lésions de l'ADN, la peroxydation des lipides et la modification des protéines qui conduisent tous à de nombreuses maladies comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'athérosclérose, des troubles neurologiques (maladie d'Alzheimer et de Parkinson), l'inflammation chronique et d'autres maladies (Jomova et Valko, 2011). Par conséquent, les extraits de *P. argentea* présentant une activité chélatante très puissante peuvent inhiber toutes ces lésions et maladies par la stabilisation des métaux de transition.

Contrairement aux activités réductrices du radical DPPH et des ions ferriques (Fe^{3+}), l'effet chélateur des ions ferreux (Fe^{2+}) ne dépend pas de la teneur en polyphénols totaux dans les différents extraits de *P. argentea*. Ces résultats sont comparables à ceux de Tan et Chan (2014). Les activités chélatantes ne peuvent pas être attribuées principalement à la teneur en polyphénols totaux mais plutôt à des polyphénols spécifiques; un échantillon riche en composés phénoliques ne peut pas chélater les métaux de transition si ces polyphénols ne possèdent pas les groupes fonctionnels nécessaires à l'activité chélatante (Jaén *et al.*, 2003; Wong *et al.* 2006; Guo *et al.*, 2007; Kalogeropoulos *et al.*, 2013). De plus, lorsqu'un groupe phénolique est conjugué avec un groupe de carbohydrate, comme dans l'état naturel des glycosides phénoliques, il ne peut plus se lier aux métaux (Wong *et al.*, 2006). En général, dans l'activité chélatante des métaux, le rôle de la distribution des groupements chimiques dans les molécules des composés phénoliques est bien connue, et certaines combinaisons telles que: un groupe C4-céto avec un groupe C3 et/ou C5-hydroxyle, ou la présence d'une structure catéchol dans le noyau benzénique B, sont considérées comme des sites chélatants très forts pour les ions métalliques (Guo *et al.*, 2007).

Les résultats obtenus ont révélé que l'EBr semble avoir un effet chélateur des métaux mieux que celui de l'ECh et l'EAc. Ceci peut être expliqué par l'interaction des différents flavonoïdes (Sánchez-Vioque *et al.*, 2013) et/ou d'autres composés présents dans les extraits avec une structure chimique favorable à la complexation des métaux (Klaus *et al.*, 2015).

3.7. Activité anti-hémolytique *in-vitro* en utilisant l'AAPH

Le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) a été largement utilisé en tant que générateur de radicaux libres, soluble dans l'eau, capable d'induire la peroxydation des lipides et d'endommager les protéines. Les radicaux peroxydes de l'AAPH sont produits par décomposition thermique d'un composé azoïque en présence d'oxygène à une température

physiologique (Phrueksanan *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014). Dans la présente étude, l'hémolyse des érythrocytes a été évaluée afin d'enquêter sur l'effet protecteur des extraits de *P. argentea* sur les érythrocytes traités par l'AAPH. Les résultats montrent que l'incubation des érythrocytes avec l'AAPH conduit à une hémolyse remarquable. Toutefois, une pré-incubation avec les extraits de *P. argentea* inhibe très significativement l'hémolyse des érythrocytes induite par l'AAPH (**Figure 35**). Ces résultats sont en accord avec les résultats précédents (Zhang *et al.*, 2014; Phrueksanan *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2014; Liu et Huang, 2014).

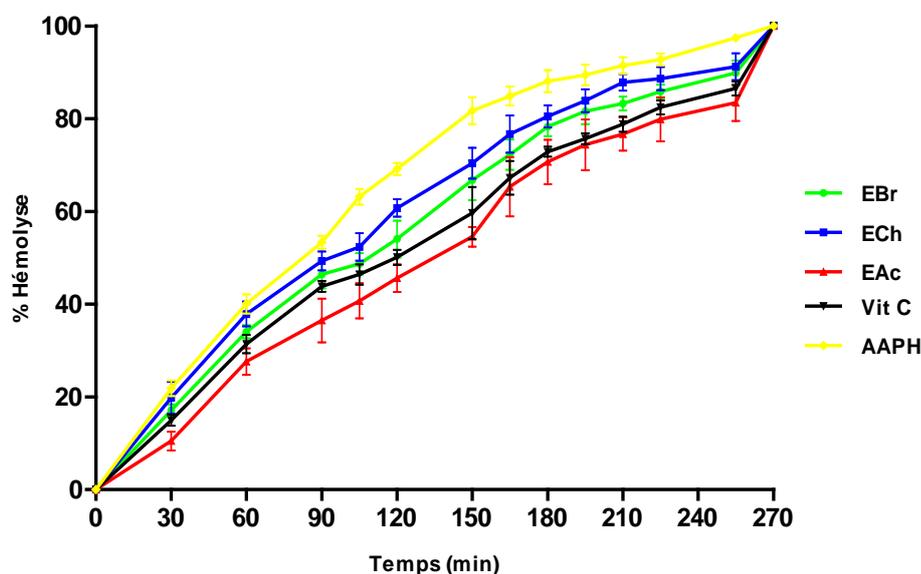


Figure 35: Pourcentage d'hémolyse des érythrocytes induite par l'AAPH en présence des extraits de *Paronychia argentea* et de la vitamine C (activité anti-hémolytique) pendant 270 minutes. Chaque point représente la moyenne \pm SD (n = 4).

Les radicaux libres attaquent les composants des membranes des érythrocytes, tels que les protéines et les lipides, et provoquent la modification de la structure et de la fonction membranaire, ce qui peut entraîner une hémolyse (Iyer *et al.*, 2013; Phrueksanan *et al.*, 2014). Les valeurs de HT₅₀ révèlent une extension importante du temps de demi-hémolyse par les trois extraits étudiés (**Figure 36**). L'effet protecteur le plus élevé a été observé avec l'EAc

($HT_{50} = 131.66 \pm 2.99$ min), suivi par la vitamine C, l'EBr et enfin l'ECh. Il ya une bonne corrélation entre le taux d'inhibition de l'hémolyse et la teneur en polyphénols totaux. Donc l'effet protecteur des érythrocytes des extraits de *P. argentea* peut être dû à la forte teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes, ce qui est similaire aux résultats de Ma *et al.* (2014).

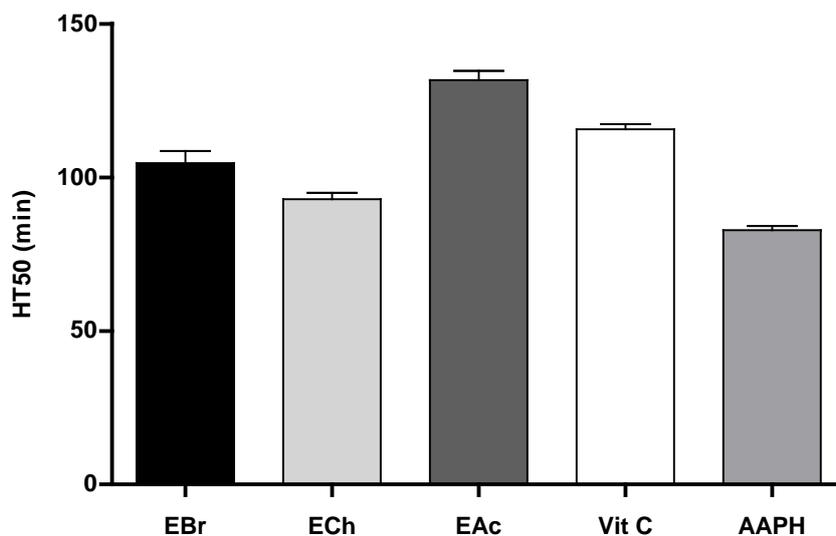


Figure 36: Le temps de demi-hémolyse des extraits de *P. argentea* et de la vitamine C. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n = 4).

4. L'activité anti-inflammatoire de *Paronychia argentea* (la colite expérimentale induite par l'acide acétique chez les souris)

4.1 Observations générales et score clinique

Dans l'étude présente, les souris des groupes traités à l'acide acétique ont rapidement développé une colite très grave, et les signes typiques: la diarrhée sanglante, la réduction de la mobilité et de la consommation de nourriture, la mauvaise qualité du pelage et la perte du poids corporel, ont été observés. L'adhérence de sang à l'anus a été observée chez certaines souris, en plus d'un taux de mortalité très élevé. Le traitement par l'extrait méthanolique de *P. argentea* améliore les paramètres mentionnés ci-dessus d'une manière dose-dépendante, et

augmente le taux de survie des souris d'une manière dépendante également de la dose (**Figure 37**). Par contre, aucune mortalité n'a été observée dans le groupe normal contrôle. Ces résultats sont en accord avec ceux des études précédentes (Niu *et al.*, 2013; Niu *et al.*, 2015; Minaiyan *et al.*, 2015).

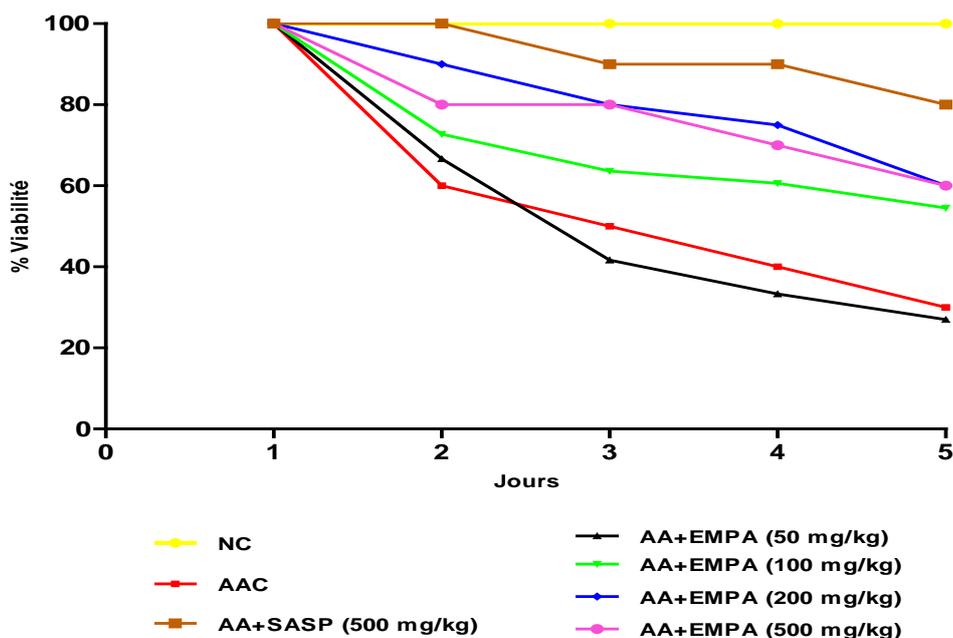


Figure 37: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* (EMPA: 50, 100, 200 et 500 mg/kg) et de la sulfasalazine (500 mg/kg) sur le taux de survie des souris malades avec colite induite par l'acide acétique, par rapport aux groupes témoins normal contrôle (NC) et acide acétique contrôle (AAC).

Comme un type de maladie inflammatoire dans le tractus intestinal, la colite ulcéreuse commence généralement dans le rectum et peut s'étendre de manière continue à impliquer la totalité du côlon et du rectum avec les symptômes suivants: une diarrhée, des douleurs abdominales, des selles sanglantes, une fièvre et une perte de poids (Jin, 2014). Dans cette recherche, par rapport au groupe contrôle de la colite, l'administration de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine (SASP) a empêché la réduction du poids corporel comme indiqué dans le **Tableau 5**.

Tableau 5: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur le score de la perte du poids corporel chez les souris avec colite induite par l'acide acétique.

Score de la perte du poids corporel	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
NC	0	0	0	0	0
AAC	0	2.4 ± 0.032 [#]	3 ± 0.041 ^{##}	3.5 ± 0.094 ^{###}	3.96 ± 0.32 ^{###}
EMPA (50 mg/kg)	0	2.33 ± 0.037 ^{ns}	2.66 ± 0.075 ^{ns}	3.33 ± 0.035 ^{ns}	3.93 ± 0.29 ^{ns}
EMPA (100 mg/kg)	0	1.16 ± 0.049 ^{ns}	1.833 ± 0.058 ^{ns}	2.0 ± 0.075 [*]	2.0 ± 0.055 ^{**}
EMPA (200 mg/kg)	0	0.83 ± 0.014 ^{ns}	1.33 ± 0.036 [*]	1.83 ± 0.085 ^{**}	1.66 ± 0.065 ^{***}
EMPA (500 mg/kg)	0	0.75 ± 0.018 ^{ns}	1.33 ± 0.089 [*]	1.91 ± 0.09 ^{**}	1.6 ± 0.039 ^{***}
SASP (500 mg/kg)	0	0.66 ± 0.028 [*]	1.16 ± 0.016 ^{**}	1.5 ± 0.014 ^{**}	1.33 ± 0.004 ^{***}

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n ≥ 3). [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ et ^{###} $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); ^{ns} $p > 0.05$, ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ et ^{***} $p < 0.001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

Le sang est apparu dans les selles de tous les groupes traités avec de l'acide acétique après l'induction de la colite. Le traitement par l'extrait méthanolique de *P. argentea* a diminué ces selles hémorragiques d'une manière dose-dépendante (**Tableau 6**).

Tableau 6: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur le score du sang dans les selles chez les souris avec colite induite par l'acide acétique.

Score du sang dans les selles	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
NC	0	0	0	0	0
AAC	4 ± 0 ^{###}	4 ± 0.032 ^{###}	3.8 ± 0.04 ^{###}	3.75 ± 0.094 ^{###}	3.66 ± 0.32 ^{###}
EMPA (50 mg/kg)	4 ± 0 ^{ns}	3.66 ± 0.037 ^{ns}	4 ± 0.037 ^{ns}	4 ± 0.037 ^{ns}	3.75 ± 0.29 ^{ns}
EMPA (100 mg/kg)	4 ± 0 ^{ns}	3.16 ± 0.05 ^{ns}	3 ± 0.049 ^{ns}	2.25 ± 0.075 ^{**}	0.5 ± 0.045 ^{****}
EMPA (200 mg/kg)	4 ± 0 ^{ns}	2.8 ± 0.014 ^{ns}	2.2 ± 0.036 ^{**}	1.6 ± 0.085 ^{***}	0.2 ± 0.065 ^{****}
EMPA (500 mg/kg)	4 ± 0 ^{ns}	3.16 ± 0.02 ^{ns}	2.3 ± 0.048 [*]	1.7 ± 0.093 ^{***}	0.25 ± 0.039 ^{****}
SASP (500 mg/kg)	4 ± 0 ^{ns}	2.58 ± 0.028 [*]	1.7 ± 0.016 ^{***}	0.6 ± 0.014 ^{****}	0 ^{****}

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n ≥ 3). ^{###} p < 0.001 (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); ^{ns} p > 0.05, ^{*} p < 0.05, ^{**} p < 0.01, ^{***} p < 0.001 et ^{****} p < 0.0001 comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

Les changements de la consistance des selles en une diarrhée ont été observés immédiatement après l'administration de l'acide acétique chez tous les groupes traités, cet état a été amélioré après le traitement avec l'extrait méthanolique de *P. argentea* d'une manière dose-dépendante (**Tableau 7**).

Tableau 7: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur le score de la consistance des selles chez les souris avec colite induite par l'acide acétique.

Score de la consistance des selles	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5
NC	0	0	0	0	0
AAC	4 ± 0 ^{###}	3.8 ± 0.44 ^{###}	3.71 ± 0.4 ^{###}	3.6 ± 0.82 ^{###}	3.2 ± 0.32 ^{###}
EMPA (50 mg/kg)	4 ± 0 ^{ns}	3.75 ± 0.64 ^{ns}	3.75 ± 0.21 ^{ns}	3.75 ± 0.65 ^{ns}	3.5 ± 0.19 ^{ns}
EMPA (100 mg/kg)	4 ± 0 ^{ns}	3.54 ± 0.57 ^{ns}	2.9 ± 0.56 ^{ns}	2.16 ± 0.39 ^{**}	1.16 ± 0.34 ^{***}
EMPA (200 mg/kg)	4 ± 0 ^{ns}	3.2 ± 0.48 ^{ns}	2.28 ± 0.69 ^{**}	1.5 ± 0.34 ^{***}	0 ^{****}
EMPA (500 mg/kg)	4 ± 0 ^{ns}	3.0 ± 0.8 ^{ns}	2.42 ± 0.98 ^{**}	1.2 ± 0.4 ^{***}	0 ^{****}
SASP (500 mg/kg)	4 ± 0 ^{ns}	2.5 ± 0.76 ^{**}	1.62 ± 0.62 ^{***}	0.71 ± 0.55 ^{****}	0 ^{****}

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n ≥ 3). ^{###} $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); ^{ns} $p > 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ et ^{****} $p < 0.0001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

Aucun des changements décrits ont été observés dans le groupe normal contrôle. Cependant, les souris ont montré une augmentation de la diarrhée avec du sang et du mucus dans la phase précoce après l'induction de la colite avec de l'acide acétique. Cela pourrait être dû aux effets néfastes directs de l'acide acétique ainsi que des altérations de la fonction épithéliale par les produits libérés à partir des mastocytes activés (Ghatule *et al.*, 2012). Nous avons également constaté que le traitement avec l'extrait méthanolique de *P. argentea* a diminué la diarrhée et le sang dans les selles, et il a amélioré le poids corporel des souris, cela est dû à la restauration des fonctions épithéliales (Ghatule *et al.*, 2012).

Par conséquent, l'extrait méthanolique de *P. argentea* à 100, 200 et 500 mg/kg réduit significativement ($p < 0.001$) l'indice d'activité de la maladie (IAM), un paramètre clinique qui reflète la gravité de la perte du poids corporel, les saignements rectaux et de la consistance des selles (**Figure 38**), et que les doses 200 mg/kg et 500 mg/kg ont presque le même effet sur

ces paramètres. Ce qui montre le potentiel thérapeutique de cette plante à améliorer les symptômes de cette maladie intestinale inflammatoire. Ces résultats sont en accord avec ceux de Niu *et al.* (2013; 2015) et Gupta *et al.* (2015).

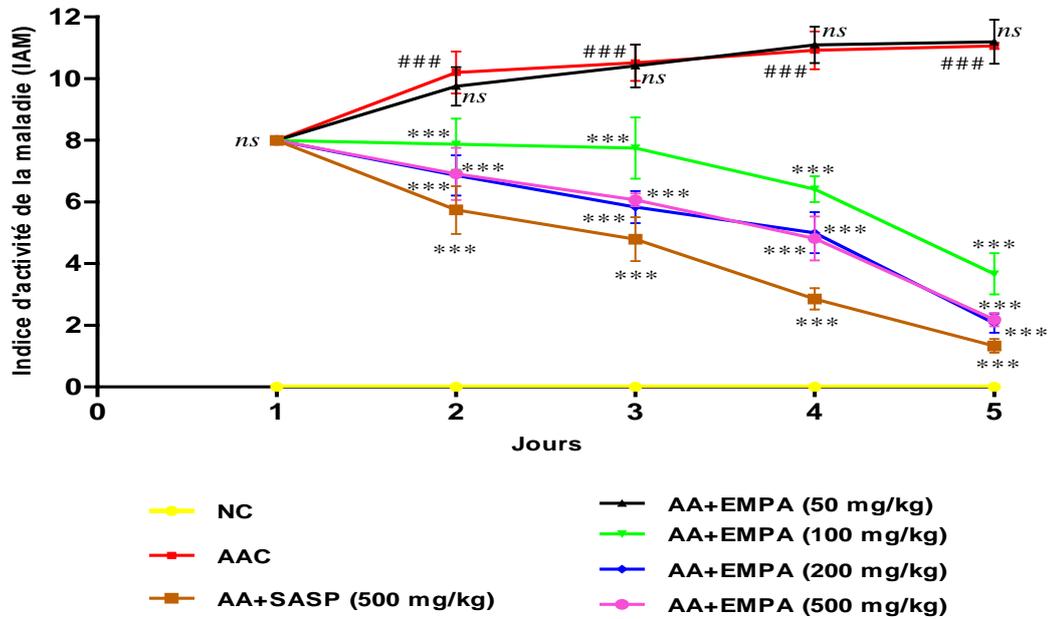


Figure 38: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur l'indice d'activité de la maladie (IAM) des souris avec colite induite par l'acide acétique, par rapport aux groupes témoins normal contrôle (NC) et acide acétique contrôle (AAC). Chaque point représente la moyenne \pm SEM ($n \geq 3$). ### $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); ns $p > 0.05$ et *** $p < 0.001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

4.2. Score macroscopique

Le poids du côlon inflammé est considéré comme un indicateur fiable et sensible pour démontrer la gravité de la réponse inflammatoire (Niu *et al.*, 2013; Vinod Prabhu et Guruvayoorappan, 2014). De même, le poids du côlon, la largeur et le rapport poids/longueur sont considérés comme un indice de l'inflammation locale avec les autres paramètres de l'œdème et l'épaississement de la paroi du côlon (Dodda *et al.*, 2014).

En accord avec les conclusions ci-dessus, l'enquête présente a démontré que, l'instillation intrarectale d'acide acétique a causé des inflammations œdémateuses macroscopiques très graves dans le côlon, ce qui induit un raccourcissement du côlon (**Figure 39a**) et l'augmentation de son poids (**Figure 39b**), ainsi que l'augmentation de son épaisseur et de sa largeur. Tandis que de tels changements ont été améliorés par le traitement avec 100, 200 et 500 mg/kg de l'extrait méthanolique de *P. argentea* d'une manière dose-dépendante, indiquant ainsi son effet curatif de la colite ulcéreuse. Cependant, le traitement avec 50 mg/kg n'a aucun effet, alors que la sulfasalazine (500 mg/kg) a montré les meilleurs résultats sur ces paramètres (**Figure 40**).

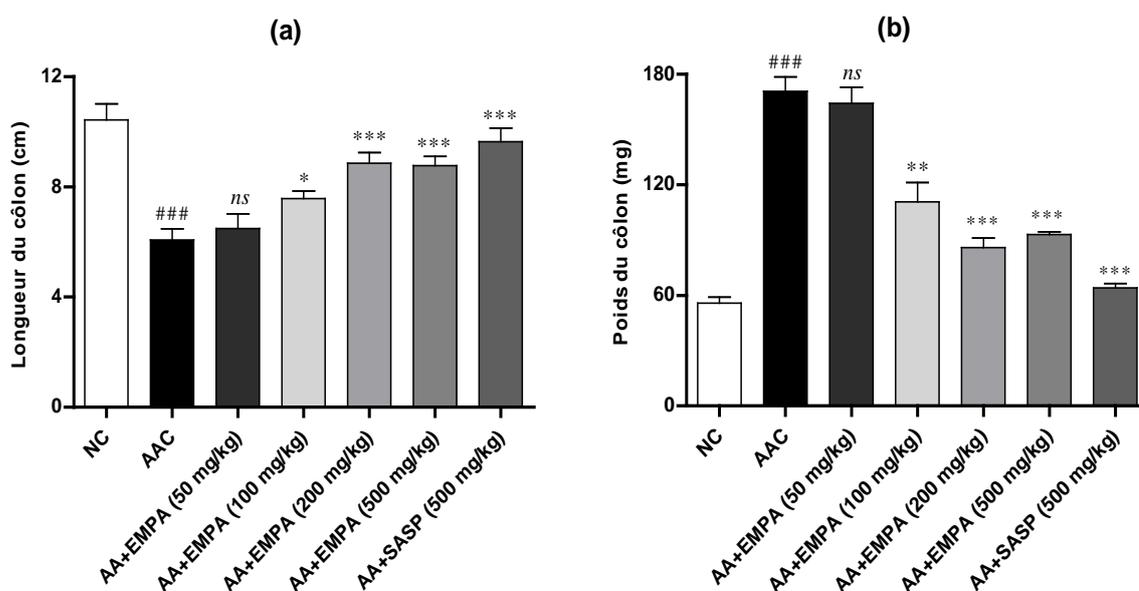


Figure 39: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur la longueur (a) et le poids (b) du côlon des souris avec colite induite par l'acide acétique, par rapport aux groupes témoins normal contrôle (NC) et acide acétique contrôle (AAC). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n \geq 3$). ### $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.



Figure 40: Images représentatives des côlons des sept groupes de souris après induction de la colite. (A) normal contrôle; (B) acide acétique contrôle; (C, D, E, F) AA+EMPA (50, 100, 200 et 500 mg/kg, respectivement); (G) AA+SASP (500 mg/kg).

Plusieurs études ont suggéré que l'instillation intrarectale de l'acide acétique a causé une insuffisance dans la macroscopie colique caractérisée par des changements dans la longueur, le poids, l'épaisseur et la largeur du côlon en raison de la nécrose de la muqueuse et l'inflammation qui se prolonge dans la couche sous-muqueuse, ou des couches musculaires (Dodda *et al.*, 2014).

La réponse inflammatoire initiée par l'acide acétique augmente la production des espèces réactives de l'oxygène, comme les radicaux hydroxyles et les peroxydes conduisant à l'érosion de la muqueuse et la distorsion. Il a été montré que l'inflammation du côlon est une réponse immunitaire locale intense caractérisée par une augmentation d'infiltration des neutrophiles dans le tissu intestinal, l'œdème, l'ulcération et la nécrose (Minaiyan *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2015). Le changement du poids corporel et le score des dommages macroscopiques

étaient les principaux paramètres pour évaluer le degré d'inflammation du côlon dans la maladie inflammatoire de l'intestin (Niu *et al.*, 2013).

Donc, l'activité macroscopique de la colite induite par l'acide acétique a été observée dans notre étude. Les côlons des souris traitées par l'acide acétique ont montré une inflammation sévère caractérisée par une ulcération marquée, un œdème et des érosions, alors que les côlons des souris témoins normales n'ont montré aucune inflammation. Le traitement avec l'extrait méthanolique de *P. argentea* (100, 200 et 500 mg/kg) et la sulfasalazine a diminué tous les paramètres décrits ci-dessus dans les côlons (**Figure 41**).

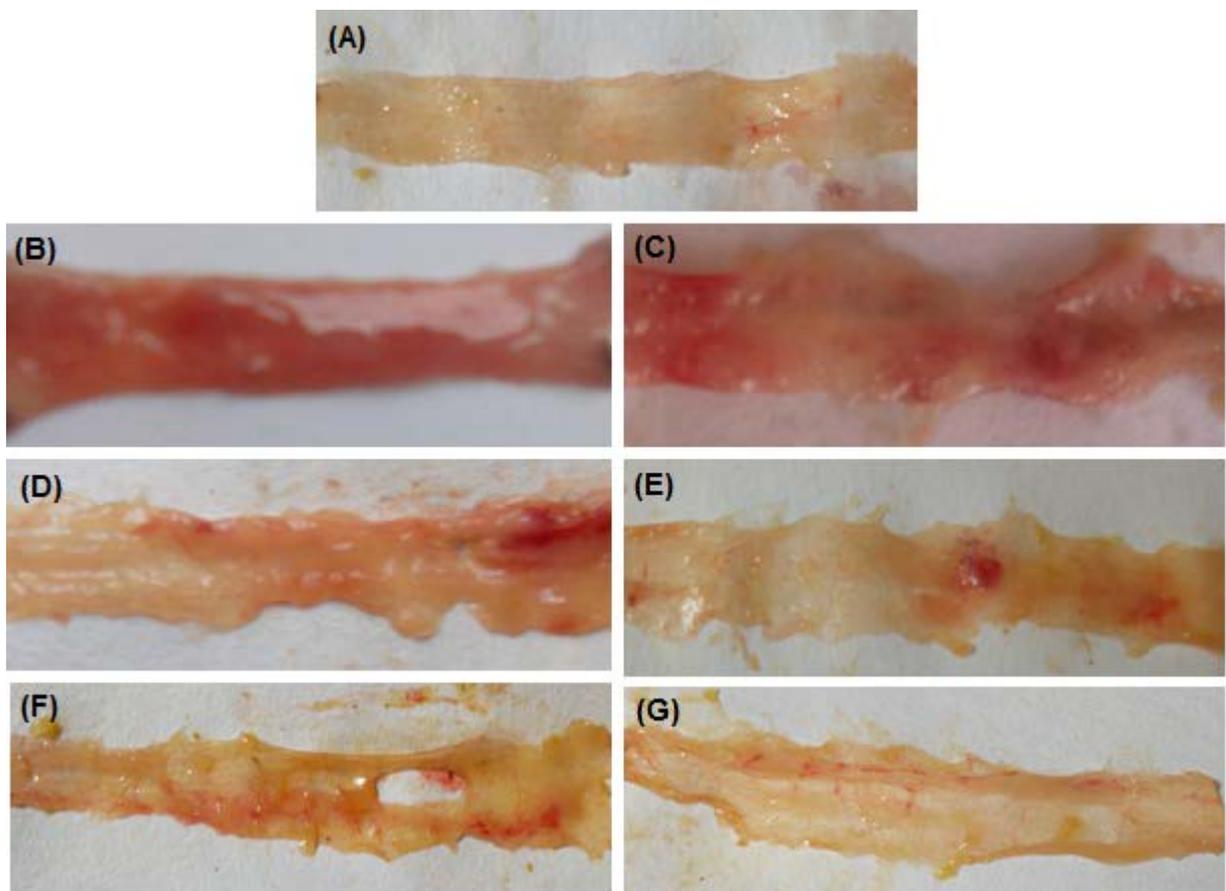


Figure 41: Aspects macroscopiques des muqueuses coliques des sept groupes de souris après induction de la colite. (A) normal contrôle. (B) acide acétique contrôle. (C, D, E, F) AA+EMPA (50, 100, 200 et 500 mg/kg, respectivement). (G) AA+SASP (500 mg/kg).

La sévérité de la colite induite par l'acide acétique a été évaluée par l'analyse du score macroscopique, comme le montre la **Figure 42**. L'administration de l'extrait méthanolique de *P. argentea* (100, 200 et 500 mg/kg) a amélioré le score macroscopique après l'instillation de l'acide acétique de façon significative et dépendante de la dose (**Figure 42**). Dans le groupe normal contrôle il n'y avait aucun dommage visible. Par conséquent, le traitement avec l'extrait méthanolique de *P. argentea* et la sulfasalazine pourraient inhiber la colite ulcéreuse de façon très significative, ce qui est en accord avec les résultats de Kannan et Guruvayoorappan (2013), Niu *et al.* (2013; 2015) et Gupta *et al.* (2015).

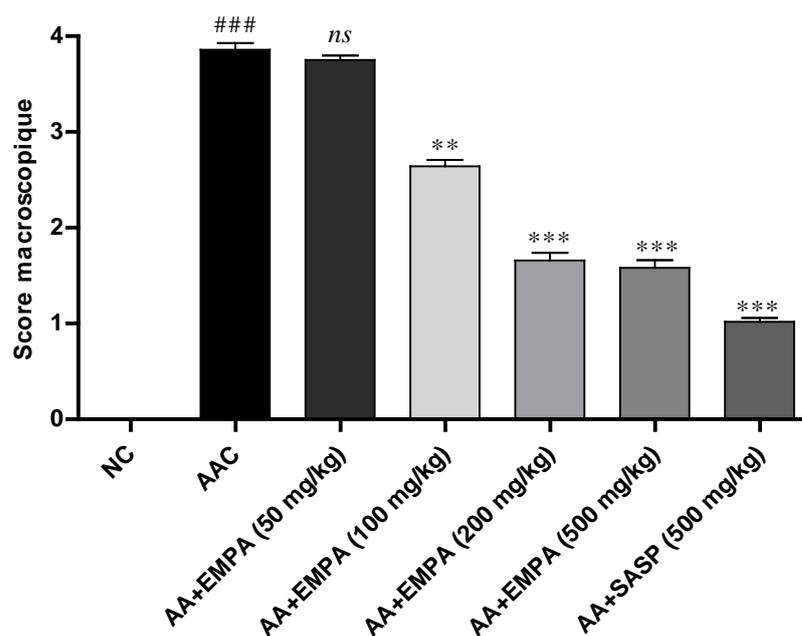


Figure 42: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur le score macroscopique chez les souris avec colite induite par l'acide acétique, par rapport aux groupes témoins normal contrôle (NC) et acide acétique contrôle (AAC). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n \geq 3$). ### $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); ^{ns} $p > 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ et ^{***} $p < 0.001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

L'augmentation considérable du poids du côlon, du rapport poids/longueur du côlon, de la diarrhée, des saignements rectaux, du score macroscopique, des altérations histologiques, de l'érosion des cellules épithéliales et de la diminution du poids corporel, sont des indicateurs de la sévérité de l'inflammation en cas de colite (Kandhare *et al.*, 2012). Dans notre étude, l'instillation de l'acide acétique seul provoque l'élévation significative de ces paramètres. Cependant, le traitement par l'extrait méthanolique de *P. argentea* conduit à une diminution dose-dépendante des paramètres mentionnés ci-dessus, ce qui explique ses activités anti-inflammatoires et anti-ulcéreuses.

4.3. Effet de *P. argentea* sur les marqueurs de l'inflammation

4.3.1. Effet sur les valeurs de VS et CRP

Afin d'évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique de *P. argentea*, les valeurs de la VS dans la 1^{ère} et la 2^{ème} heure ont été mesurées. Les résultats présentés dans la **Figure 43** montrent que les doses de 100, 200 et 500 mg/kg de l'extrait méthanolique de *P. argentea* ont la capacité de réduire les VS élevées dans la première et la deuxième heure ($p < 0.05$). Cependant, les souris malades et traitées avec 50 mg/kg de l'extrait méthanolique de *P. argentea* ont les mêmes VS que les souris malades contrôles.

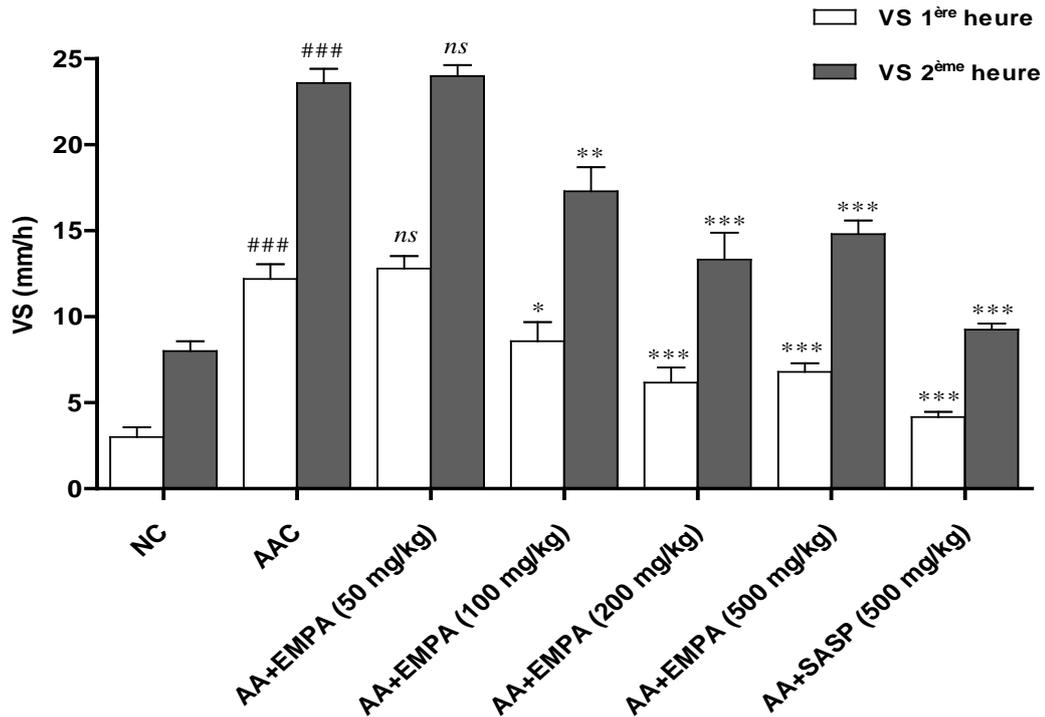


Figure 43: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur la vitesse de sédimentation des érythrocytes (VS) dans la 1^{ère} et la 2^{ème} heure chez les souris avec colite induite par l'acide acétique, par rapport aux groupes témoins normal contrôle (NC) et acide acétique contrôle (AAC). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n \geq 3$). ### $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); ^{ns} $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

La vitesse de sédimentation est utilisée comme un marqueur des maladies inflammatoires (Boopala Bhagavan *et al.*, 2013), en évaluant la capacité des érythrocytes à se lier aux marqueurs d'inflammation ce qui provoque leur sédimentation (Kainth et Gigliotti, 2014). La VS est généralement considéré comme un indice non-spécifique de l'activité pathologique utile dans le suivi des patients atteints de certaines maladies chroniques telle que la polyarthrite rhumatoïde (Corsonello *et al.*, 2011). En effet, l'augmentation de la VS est dû à l'élévation des concentrations sériques en protéines de la phase aiguë de l'inflammation, en fibrinogène, en immunoglobulines, ainsi qu'en réponse à l'anémie (Reinhart, 2006; Hariharan et Kabrhel, 2011; Kainth et Gigliotti, 2014).

La protéine C-réactive (CRP) est une protéine pro-inflammatoire de la phase aiguë produite par le foie en réponse à une infection, une blessure, un traumatisme ou une inflammation (Hariharan et Kabrhel, 2011; Kainth et Gigliotti, 2014). En utilisant ce test dans notre étude, les résultats montrent que la concentration de la CRP est diminuée de 25.01 ± 2.041 mg/L chez les souris contrôles colitiques à 8.5 ± 0.95 mg/L chez les souris traitées avec l'extrait méthanolique de *P.argentea* (200 mg/kg). Cet effet est de manière dose-dépendante (**Figure 44**). La diminution de la sévérité de la colite chez les souris traitées par la sulfasalazine (500 mg/kg) par rapport au groupe témoin de la colite a été en outre mise en évidence par une diminution de 5 fois du taux de CRP sérique (**Figure 44**).

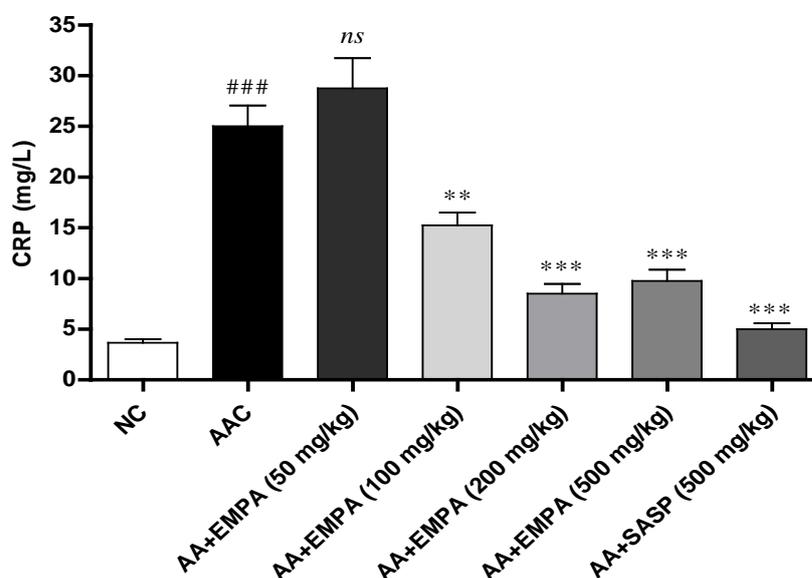


Figure 44: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur les taux de CRP sérique chez les souris avec colite induite par l'acide acétique, par rapport aux groupes témoins normal contrôle (NC) et acide acétique contrôle (AAC). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n \geq 3$). ### $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); *ns* $p > 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

A l'état normale, la CRP existe sous forme de trace dans le sang, mais quelques minutes après l'événement aigu: une blessure, une inflammation ou une infection, on observe très rapidement une augmentation de la concentration de cette protéine jusqu'à 1000 fois sa concentration initiale (Dupuy *et al.*, 2003).

Les biomarqueurs d'inflammation dans la colite ulcéreuse sont couramment utilisés pour compléter l'évaluation clinique de l'activité de la maladie. Les marqueurs les plus fréquemment contrôlés sont la CRP et la VS. Lors de l'évaluation des patients atteints d'une fièvre ou d'une autre maladie inflammatoire, la vitesse de sédimentation et la protéine C-réactive sont couramment ordonnées en tandem (Kainth et Gigliotti, 2014). Par conséquent, les résultats présents des tests de VS et CRP indiquent que *P. argentea* présente une activité anti-inflammatoire très significative.

4.3.2. Effet sur les valeurs de FNS

Les démonstrations cliniques de la maladie inflammatoire intestinale comprennent les déséquilibres hématologiques aggravés conduisant à une diarrhée inexplicée (Patil *et al.*, 2012). Donc, une numération formule sanguine (FNS) a été effectuée dans notre étude, et les résultats ont montré que les souris malades contrôles ont présenté une diminution significative des paramètres hématologiques: les globules blancs (GB), les globules rouges (GR), l'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (HCT) et les plaquettes (PLA), par rapport aux souris normales contrôles comme indiqué dans le **Tableau 8**. Le traitement avec 100, 200 et 500 mg/kg de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et 500 mg/kg de sulfasalazine a entraîné une augmentation significative de ces paramètres hématologiques par rapport aux souris témoins malades, et ces résultats sont en accord avec ceux de Gupta et ses collaborateurs (2015).

Tableau 8: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur les valeurs de FNS chez les souris avec colite induite par l'acide acétique.

Numération Formule Sanguine (FNS)	GB ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	GR ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	HCT (%)	PLA ($\times 10^5/\mu\text{L}$)
NC	11.03 \pm 0.54	10.01 \pm 0.65	15.83 \pm 0.44	43.57 \pm 0.33	14.6 \pm 0.45
AAC	4.67 \pm 0.089 ^{###}	4.84 \pm 0.30 ^{###}	9.86 \pm 0.24 ^{###}	30.07 \pm 0.63 ^{###}	7.54 \pm 0.31 ^{###}
EMPA (50 mg/kg)	4.92 \pm 0.075 ^{ns}	5 \pm 1 ^{ns}	9.93 \pm 0.37 ^{ns}	32.95 \pm 1.45 ^{ns}	7.8 \pm 0.2 ^{ns}
EMPA (100 mg/kg)	7.43 \pm 0.56 ^{**}	7.65 \pm 0.28 ^{**}	12.4 \pm 0.30 ^{**}	36.47 \pm 0.86 ^{**}	10.15 \pm 0.37 ^{**}
EMPA (200 mg/kg)	9.16 \pm 0.44 ^{***}	8.75 \pm 0.35 ^{***}	13.97 \pm 0.14 ^{***}	39.97 \pm 0.60 ^{***}	12.07 \pm 0.073 ^{***}
EMPA (500 mg/kg)	8.91 \pm 0.31 ^{***}	8.64 \pm 0.96 ^{***}	13.83 \pm 0.16 ^{***}	38.83 \pm 0.72 ^{***}	11.86 \pm 0.11 ^{***}
SASP (500 mg/kg)	10.3 \pm 0.51 ^{***}	9.14 \pm 0.77 ^{***}	14.67 \pm 0.28 ^{***}	42.2 \pm 0.8 ^{***}	13.53 \pm 0.84 ^{***}

Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n \geq 3$). ^{###} $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); ^{ns} $p > 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ et ^{***} $p < 0.001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

La mesure des taux de CRP et de VS sont les tests les plus couramment utilisés pour surveiller et détecter les troubles inflammatoires. La VS et la CRP sont les deux marqueurs sensibles de l'inflammation et qui présentent une bonne corrélation avec la gravité de l'inflammation, mais ils ne sont pas spécifiques à une maladie particulière (Calderon et Wener, 2012). De plus, l'hématologie donne un aperçu de l'état de la maladie de la colite, car les différents composants du sang ont été modifiés de manière disproportionnée (Jagtap *et al.*, 2011). Par conséquent, dans cette étude, le traitement avec l'extrait méthanolique de *P. argentea* a réduit l'inflammation du côlon, résultant en la diminution des taux élevés de VS et CRP, et l'élévation des valeurs réduites de la FNS.

4.4. Effet de *P. argentea* sur les paramètres antioxydants

4.4.1. Effet sur la peroxydation lipidique par le dosage du taux de malondialdéhyde (MDA) dans le côlon

Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène ont été signalés à être présents dans les échantillons colorectaux en cas de colite ulcéreuse (Bitiren *et al.*, 2010). La peroxydation des lipides, un indicateur des lésions de la muqueuse induites par les espèces réactives de l'oxygène, a été mesurée comme les substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS). D'autre part, le malondialdéhyde, le produit de la peroxydation des lipides, est estimé par une réaction avec l'acide thiobarbiturique (Satish Kumar *et al.*, 2015).

Dans cette étude, les variations de la teneur en MDA chez les souris témoins malades et les souris traitées par l'extrait méthanolique de *Paronychia argentea* sont représentées dans la (**Figure 45**). Aucun changement n'a été observé dans le contenu de MDA entre le groupe malade contrôle et le groupe traité par 50 mg/kg de l'extrait méthanolique de *P. argentea*. Dans ces deux groupes, les animaux ont présenté des taux très élevés en MDA dans les tissus du côlon. Ces résultats sont en accord avec ceux de Niu *et al.* (2015), qui ont trouvé que le contenu de MDA dans le côlon des souris a été considérablement accéléré après induction de la colite ulcéreuse par l'acide acétique, révélant donc que l'acide acétique stimule la peroxydation lipidique. Par contre, dans les groupes qui ont reçu 100, 200 et 500 mg/kg de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et 500 mg/kg de la sulfasalazine, les taux de MDA étaient très significativement réduits et d'une manière dose-dépendante (**Figure 45**).

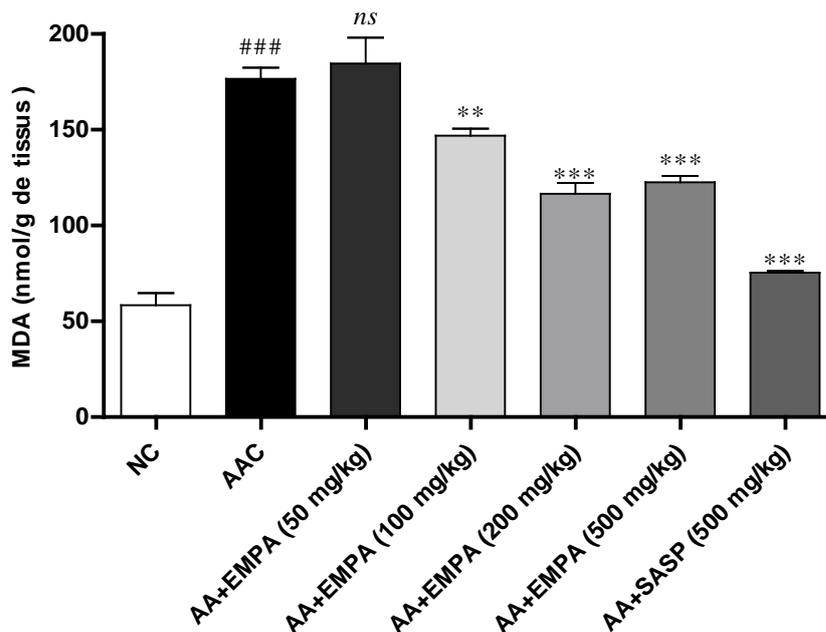


Figure 45: Effets anti-péroxydation lipidique des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine en mesurant les taux de MDA colique chez les souris avec colite induite par l'acide acétique, par rapport aux groupes témoins normal contrôle (NC) et acide acétique contrôle (AAC). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n \geq 3$). ### $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); *ns* $p > 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

Le MDA est un produit final du processus de peroxydation des lipides, connu comme un marqueur du stress oxydatif qui aboutit finalement à des dommages cellulaires (Sid *et al.*, 2013; Dodda *et al.*, 2014). Il a été rapporté que les patients de la maladie inflammatoire de l'intestin ont des concentrations élevées de peroxydes lipidiques en raison du déséquilibre entre les mécanismes pro-oxydants et antioxydants qui accumulent des protéines et des lipides modifiés par le stress oxydatif (Vinod Prabhu et Guruvayoorappan, 2014). Par conséquent, le traitement par des piègeurs de radicaux libres et la réduction du stress oxydatif peut conduire à la réduction de la colite ulcéreuse (Jena *et al.*, 2012). Dans notre étude, le traitement par *P. argentea* inhibe de manière significative l'augmentation du taux de MDA dans les tissus du côlon. Ces résultats peuvent refléter le rôle protecteur de cette plante contre la rectocolite hémorragique en réduisant les radicaux libres (effet scavenger) et la prévention des lésions de

la membrane (la capacité anti-péroxydation lipidique). Ce qui est similaire aux résultats de Kannan et Guruvayoorappan (2013) et ceux de Vinod Prabhu et Guruvayoorappan (2014).

4.4.2. Effet sur le taux de glutathion réduit (GSH) dans le côlon

En 2013, Karbiner et ses collaborateurs ont montré que les changements dans l'état oxydatif se manifestent par une augmentation de la capacité de peroxydation lipidique et une diminution de la capacité de défense antioxydante du système de glutathion. Dans notre étude, les concentrations du glutathion réduit (GSH) dans le tissu du côlon ont été déterminées. Les taux de GSH étaient très significativement réduits après l'induction de la colite. L'administration de l'extrait méthanolique de *P. argentea* a augmenté les concentrations de GSH significativement et d'une manière dose-dépendante par rapport aux souris témoins malades (Figure 46). Ces résultats sont comparables à ceux de Vinod Prabhu et Guruvayoorappan (2014), Dodda *et al.* (2014) et Cazarin *et al.* (2015).

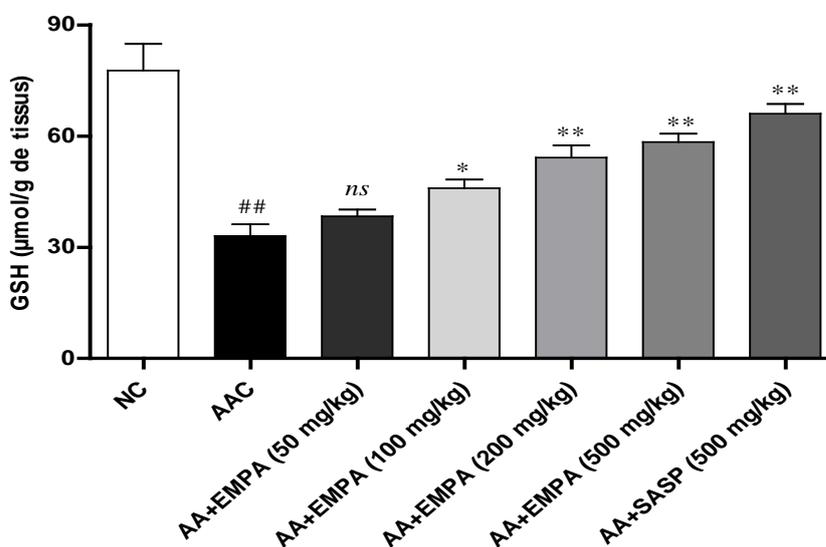


Figure 46: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur les taux de GSH colique chez les souris avec colite induite par l'acide acétique, par rapport aux groupes témoins normal contrôle (NC) et acide acétique contrôle (AAC). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n \geq 3$). ## $p < 0.01$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); *ns* $p > 0.05$, * $p < 0.05$ et *** $p < 0.01$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

Les taux de GSH ont été sensiblement diminués chez les souris malades. Par contre, l'administration de l'extrait méthanolique de *P. argentea* a augmenté les concentrations de GSH. Cela montre l'effet anti-inflammatoire de cette plante, qui peut être due à sa capacité à libérer le dipeptide antioxydant γ -Glu-Cys et donc la synthèse de glutathion (Peran *et al.*, 2006). Les espèces réactives de l'oxygène contribuent à une lésion tissulaire dans les maladies intestinales inflammatoires, et le glutathion est l'antioxydant intracellulaire le plus important (Kannan et Guruvayoorappan, 2013; El-Medany *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2015). Il est synthétisé à partir des acides aminés: glycine, glutamate et cystéine. Le GSH peut neutraliser directement les espèces réactives de l'oxygène telles que les peroxydes lipidiques, et protège le corps contre la pancréatite, l'inflammation gastrique, les ulcères de l'estomac et les maladies inflammatoires de l'intestin y compris la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn (Vinod Prabhu et Guruvayoorappan, 2014). Cependant, la carence en GSH est à l'origine d'une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (El-Medany *et al.*, 2005). Donc, nos résultats expliquent l'effet protecteur considérable de *P. argentea* et son utilisation dans les maladies inflammatoires de l'intestin.

4.4.3. Effet sur l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) dans le côlon

Pour réguler les taux des espèces réactives de l'oxygène, la muqueuse intestinale possède un complexe de systèmes antioxydants où le superoxyde dismutase (SOD) est l'enzyme antioxydante qui convertit l'anion superoxyde en H_2O_2 (Vinod Prabhu et Guruvayoorappan, 2014). D'autre part, les valeurs élevées de cette enzyme peuvent empêcher l'adhérence des leucocytes à l'endothélium intestinal, ce qui conduit à la réduction de l'inflammation (Kannan et Guruvayoorappan, 2013). Donc, l'effet des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* sur l'activité de la SOD dans le tissu du côlon au cours de la colite ulcéreuse est représenté dans la **Figure 47**. L'activité de la SOD est très significativement ($p < 0.001$)

réduite dans les côlons des souris témoins malades par rapport aux animaux témoins normales (2.22 ± 0.097 UI/mg de protéines, et 5.096 ± 0.15 UI/mg de protéines, respectivement). Il n'y a aucun changement dans les valeurs de l'activité de la SOD du côlon chez le groupe traité par 50 mg/kg de l'extrait méthanolique de *P. argentea* par rapport au groupe malade contrôle. Alors que, les groupes traités avec 100, 200 et 500 mg/kg de cette plante et 500 mg/kg de la sulfasalazine ont montré une augmentation très significative ($p < 0.01$ et $p < 0.001$) de l'activité de la SOD colique par rapport aux animaux malades contrôles. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Xu *et al.* (2015).

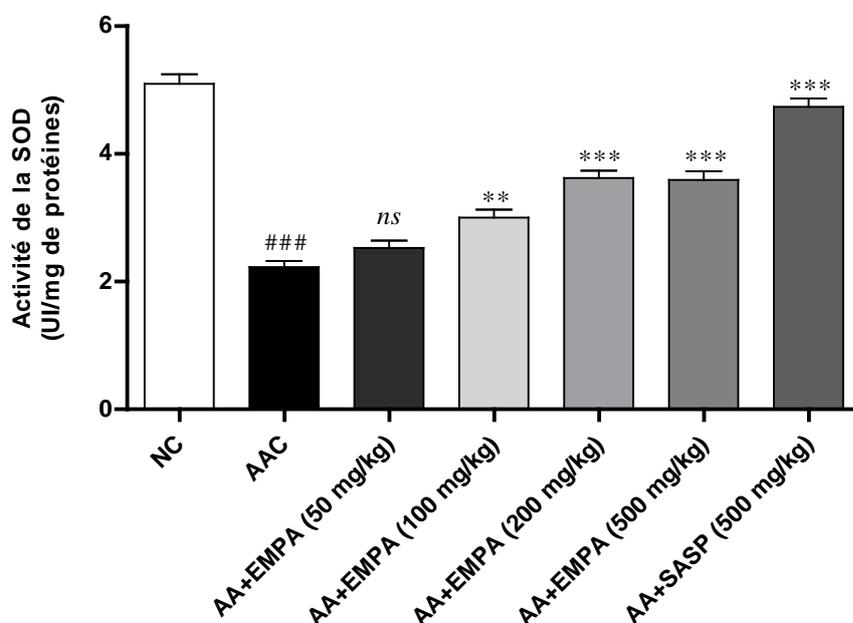


Figure 47: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur l'activité de la SOD colique chez les souris avec colite induite par l'acide acétique, par rapport aux groupes témoins normal contrôle (NC) et acide acétique contrôle (AAC). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n \geq 3$). ### $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); ns $p > 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

Le stress oxydatif joue un rôle très important dans la physiopathologie de la colite ulcéreuse et la formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène qui attaquent les macromolécules cellulaires et perturbent l'intégrité des cellules épithéliales. Les antioxydants,

tels que la superoxyde dismutase et le glutathion réduit, confèrent une protection contre les dommages oxydatifs produits par les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Niu *et al.*, 2015). La SOD inhibe l'expression des molécules d'adhésion et donc les interactions leucocytes-endothélium, ce qui joue un rôle très important dans la régulation de la maladie inflammatoire de l'intestin (Vinod Prabhu et Guruvayoorappan, 2014). D'après Kruidenier *et al.* (2003), la SOD possède une activité anti-inflammatoire très puissante et très efficace dans le traitement de l'inflammation du côlon dans la colite expérimentale en réduisant la production d'espèces réactives de l'oxygène et le stress oxydatif. Par conséquent, *P. argentea* peut être utilisée en tant que traitement anti-inflammatoire très puissant en augmentant l'activité de la SOD du tissu colique, qui réduit le stress oxydatif et la production d'espèces réactives de l'oxygène au cours de la colite ulcéreuse.

4.4.4. Effet de *P. argentea* sur l'activité de la catalase (CAT) dans le côlon

La catalase et la SOD sont impliquées dans les mécanismes de défense antioxydants des cellules. La SOD catalyse la dismutation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène moléculaire, et la CAT convertit ensuite le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène (Crespo *et al.*, 2008; Limon-Pacheco et Gonsebatt, 2009).

Dans le présent travail, les valeurs de l'activité de la CAT évaluée chez tous les animaux expérimentaux sont présentées dans la **Figure 48**. Les résultats révèlent que l'activité de la CAT a été diminuée très significativement ($p < 0.001$) chez les animaux traités par l'acide acétique par rapport à aux souris normales contrôles, tandis que le traitement avec l'extrait méthanolique de *Paronychia argentea* et la sulfasalazine augmente de manière significative l'activité de la CAT par rapport aux animaux témoins malades.

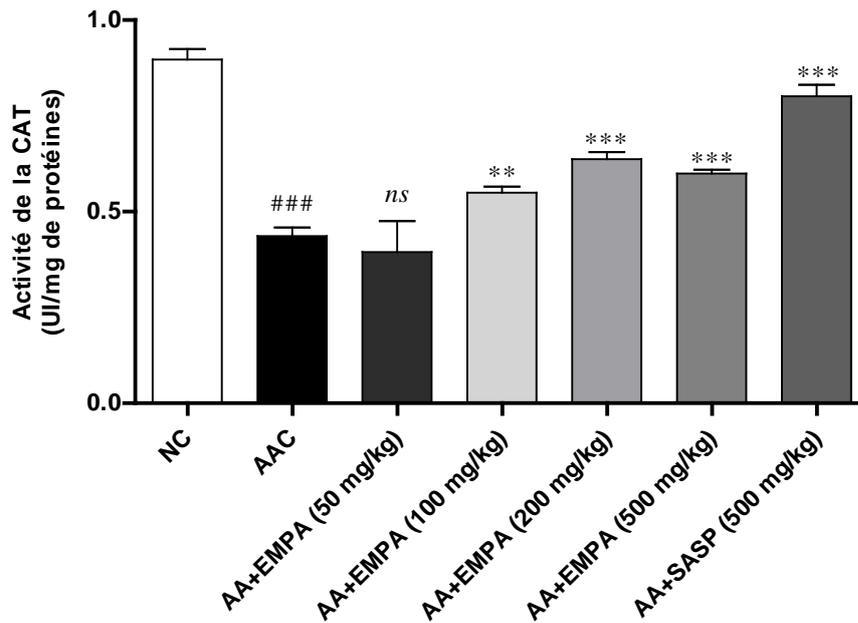


Figure 48: Effets des différentes doses de l'extrait méthanolique de *P. argentea* et de la sulfasalazine sur l'activité de la catalase (CAT) colique chez les souris avec colite induite par l'acide acétique, par rapport aux groupes témoins normal contrôle (NC) et acide acétique contrôle (AAC). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM ($n \geq 3$). ### $p < 0.001$ (acide acétique contrôle VS. normal contrôle); *ns* $p > 0.05$, ** $p < 0.01$ et *** $p < 0.001$ comparant avec le groupe acide acétique contrôle.

La réponse inflammatoire initiée par l'acide acétique augmente la production des espèces réactives de l'oxygène, menant à l'érosion de la muqueuse et la distorsion (Gupta *et al.*, 2015). Les enzymes antioxydantes jouent un rôle très important dans le piégeage des radicaux libres (Krishnan *et al.*, 2014). Par conséquent, et conformément à nos résultats, *P. argentea* est capable de réduire la colite ulcéreuse et les maladies inflammatoires par l'activation des enzymes antioxydantes et le balayage des radicaux libres.

4.5. Analyse histologique du côlon

L'étude histologique a été effectuée pour observer l'inflammation du côlon. Une destruction marquée de la muqueuse colique avec ulcération grave, infiltrat inflammatoire

sévère et d'aspect folliculaire (follicule lymphoïde) ont été observés dans les côlons d'animaux témoins traités par l'acide acétique (**Figure 49A**). Les mêmes résultats ont été trouvés chez les souris traitées avec 50 mg/kg de l'extrait méthanolique de *P. argentea* (**Figure 49B**). Par contre, le groupe contrôle normale n'a montré aucun dommage histologique ou signe d'inflammation (**Figure 50A**). De même, les souris ayant reçu la sulfasalazine ont présenté la même histologie normale sans infiltration des cellules inflammatoires (**Figure 50B**). Les groupes traités par l'acide acétique et 100, 200 et 500 mg/kg de l'extrait méthanolique de *P. argentea* ont révélé une atténuation de l'inflammation caractérisée par la suppression de l'ulcération et la réduction des infiltrats cellulaires inflammatoires (**Figure 50 C, D, E**).

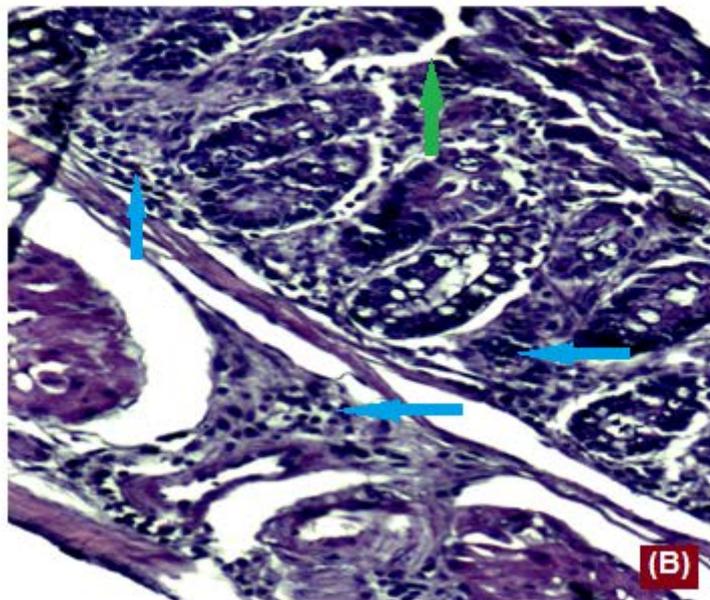
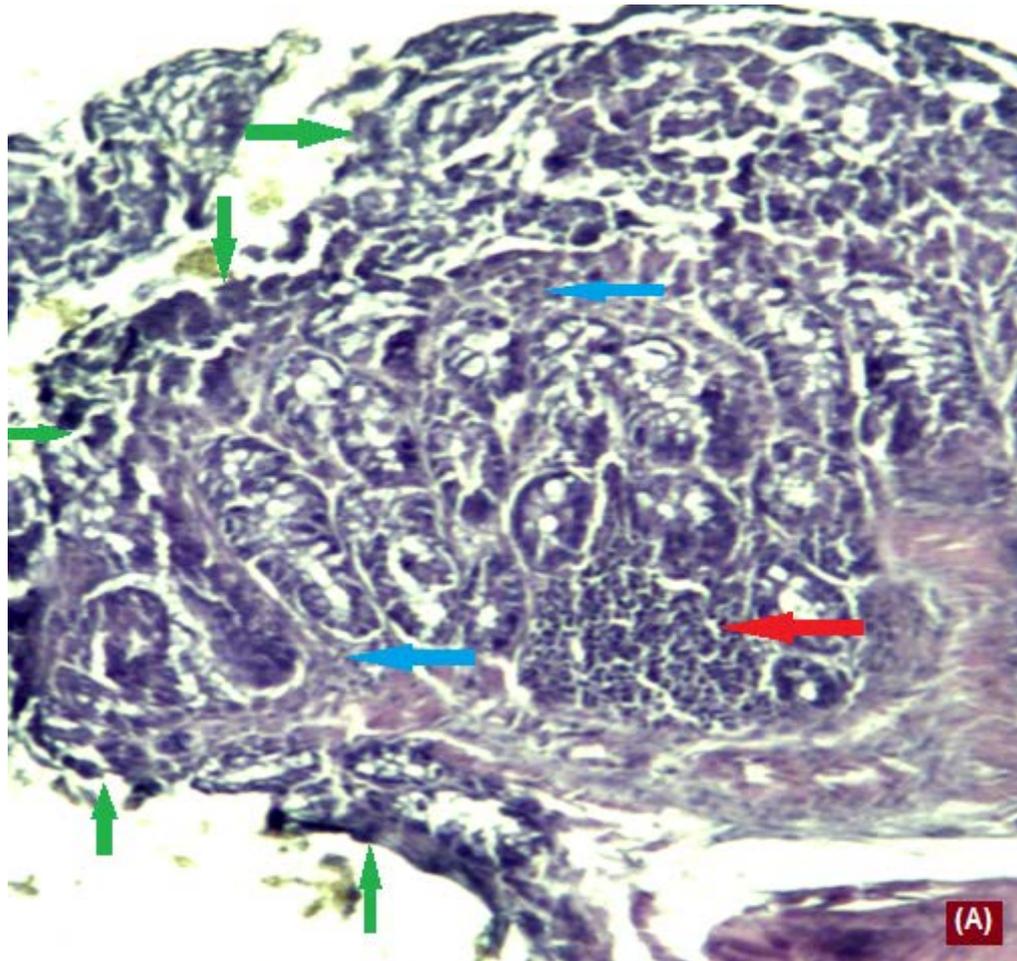


Figure 49: Coupes histologiques des côlons des souris (A) malades témoins, et (B) malades traitées par l'extrait méthanolique de *P. argentea* (50 mg/kg). Coloration hématoxyline éosine/Grossissement 200×. Flèche rouge: follicule lymphoïde. Flèche bleu: infiltrat inflammatoire sévère. Flèche verte: ulcération.

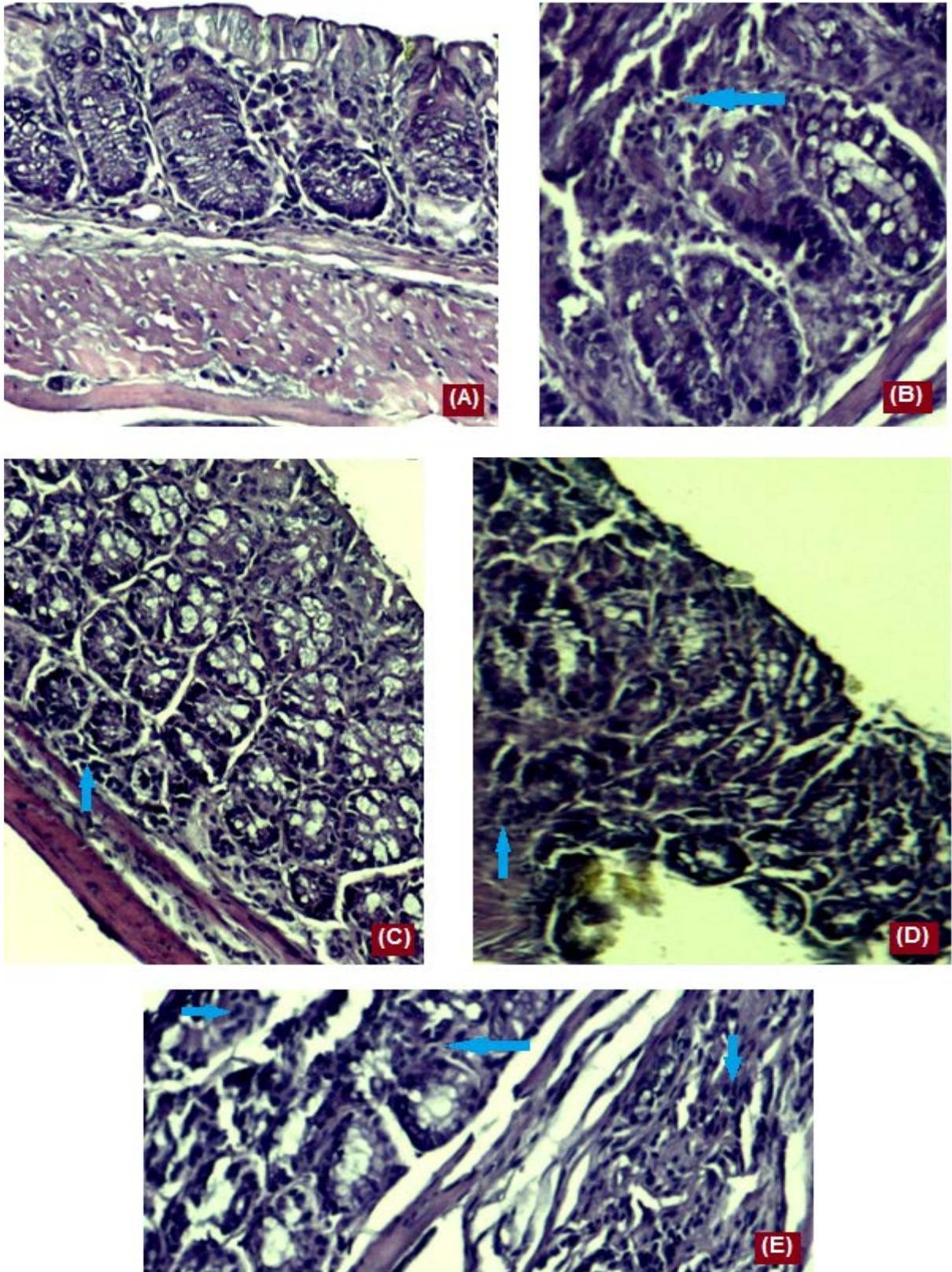


Figure 50: Coupes histologiques des côlons des souris (A) normales témoins, (B) malades traitées par la sulfasalazine, (C, D, E) malades traitées par l'extrait méthanolique de *P. argentea* (100, 200, et 500 mg/kg, respectivement). Coloration hématoxyline éosine/Grossissement 200×. Flèche: diminution de l'infiltrat inflammatoire.

Nos résultats sont en accord avec les conclusions précédentes (Miaol *et al.*, 2015; Pandurangan *et al.*, 2015; Matsuo *et al.*, 2015). De plus, El-Gowelli *et al.*(2015) ont montré que des sections de côlons des rats traités avec de l'acide acétique seul ont présenté de multiples ulcères sévères, une infiltration des cellules inflammatoires et des changements de l'architecture du côlon (zones oedémateuses). Ces changements suggèrent que le modèle de colite a été établi avec succès (Chu *et al.*, 2015). Dans la présente étude, une atténuation de ces dommages intestinaux et de l'infiltration des lymphocytes chez les souris traitées par l'extrait méthanolique de *P. argentea* ont été observés, ce qui indique que cette plante a inhibé l'inflammation du côlon induite par l'acide acétique d'une manière très importante. D'autre part, il est bien connu que l'inflammation du côlon peut contribuer à la cancérogenèse colique (Mao *et al.*, 2015), donc, *Paronychia argentea* peut jouer un rôle essentiel dans la protection contre l'inflammation et donc le cancer du côlon.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les plantes sont utilisées dans divers troubles, par exemple, les troubles gastro-intestinaux, les problèmes génito-urinaires, les malaises hépato-biliaires et les problèmes psychologiques et respiratoires. L'intérêt pour ces plantes a augmenté dans le monde entier parce qu'ils sont faciles à préparer, moins cher, et ont peu d'effets secondaires sur les animaux et l'environnement (Van Hai, 2015). Cependant, les informations et les validations scientifiques sur les activités biologiques des plantes médicinales, y compris *Paronychia argentea*, sont encore insuffisantes. De ce fait, cette étude sur les extraits de *Paronychia argentea* vise à évaluer leurs effets antioxydant et anti-inflammatoire.

L'activité antioxydante a été évaluée *in-vitro* par plusieurs tests. Les résultats des tests d'inhibition de la XO et de piégeage de l'anion superoxyde produit par cette enzyme ont révélé que tous les extraits sont efficaces et leurs activités sont dans le même ordre pour les deux tests (ECh > EAc > EBr). La qualité des flavonoïdes présents dans chaque extrait peut déterminer leurs effets compte tenu des différences pouvant exister entre les composés extraits par chaque solvant.

Parmi les méthodes non enzymatiques utilisées, on note le test de DPPH, le test d'hémolyse induite par l'AAPH et le test de FRAP. Les résultats de ces trois tests respectivement montrent que l'EAc semble avoir l'effet anti-radicalaire, l'activité anti-hémolytique et le pouvoir réducteur les plus puissants, suivi par l'EBr puis l'ECh. La richesse de l'EAc en polyphénols totaux peut expliquer ses effets les plus puissants pour les trois tests. Cette corrélation significative peut être attribuée aux composés phénoliques détectés dans l'EAc (forme glycosidique), mais ceci n'exclue en aucun cas la contribution d'autres composés dans ces activités.

Les lipides membranaires sont riches en acides gras poly-insaturés, principalement l'acide arachidonique et l'acide linoléique, qui sont la cible privilégiée des radicaux libres. La peroxydation lipidique provoque des dommages biologiques conduisant à de nombreuses maladies comme les maladies cardiovasculaires. Dans le test de blanchissement du β -carotène, l'activité des trois extraits est plus élevée que celle des antioxydants standards: rutine et acide gallique, ainsi que l'EAc et l'ECh ont un effet inhibiteur de la peroxydation lipidique plus élevé que celui de l'EBr. Il ya donc une bonne corrélation entre l'activité antioxydante des extraits et leurs contenus en flavonoïdes qui sont capables à donner des atomes d'hydrogènes pour inhiber la peroxydation lipidique. Par ailleurs, cette activité est peut être dû à la présence de flavonoïdes ou d'autres antioxydants lipophiles qui sont capables d'inhiber la formation des radicaux lipidiques et empêchent donc la peroxydation des lipides.

L'importance de chélation des métaux de transition est attribuée à l'arrêt de la réaction de Fenton et donc la réduction de la production des radicaux OH^\bullet . Contrairement au test de blanchissement du β -carotène, les résultats du test de chélation du fer ferreux montrent que l'EBr est le chélateur le plus puissant alors que l'EAc est le plus faible. On observe donc une corrélation négative entre l'activité chélatante des extraits et leurs contenus en polyphénols totaux et en flavonoïdes. Ceci peut être expliqué par l'interaction des différents flavonoïdes et d'autres composés présents dans les extraits, avec une structure chimique spécifique favorable à la chélation des métaux.

Pour les études antioxydantes et anti-inflammatoires *in-vivo*, la colite expérimentale chez les souris a été induite par l'acide acétique. La colite se caractérise par une modification de la consistance des selles pouvant aller jusqu'à la diarrhée hémorragique et l'apparition de saignements rectaux, une diminution de la consommation alimentaire des animaux associée à une perte du poids corporel, ainsi que par un taux de mortalité très élevé. Les résultats de

notre étude ont révélé que le traitement des souris par l'extrait méthanolique de *Paronychia argentea* a permis de limiter ces signes cliniques très significativement.

L'inflammation colique se caractérise également par une augmentation des dommages macroscopiques et du poids du côlon, ainsi qu'une rétraction de la longueur du côlon. Cependant, le traitement des animaux malades avec l'extrait de *Paronychia argentea* a diminué les paramètres décrits ci-dessus selon sa concentration. Cette plante peut donc avoir un effet protecteur très important contre l'inflammation du côlon.

L'augmentation des taux de CRP et de VS ainsi que la diminution des valeurs de FNS dans le sang sont les marqueurs d'inflammation colique les plus utilisés. Le traitement des souris qui ont une colite par les différentes doses de l'extrait méthanolique de *Paronychia argentea* a permis de réduire les taux de CRP et VS, et d'augmenter les valeurs de FNS, et donc de limiter l'inflammation colique en fonction aux concentrations de cet extrait.

Dans la colite ulcéreuse, l'implication des cellules inflammatoires est associée à une augmentation des ERO dans la muqueuse intestinale. Ceci conduit à une réduction de la capacité défensive antioxydante du système de glutathion et une augmentation de la peroxydation lipidique dans le côlon, ainsi qu'une diminution significative de l'activité des enzymes antioxydantes SOD et CAT. L'injection des souris par l'extrait de *Paronychia argentea* a provoqué une augmentation très importante des taux de GSH et une réduction (dose-dépendante) des concentrations de MDA au niveau du côlon. De plus, le traitement par cet extrait stimule d'une manière très significative l'activité de la SOD et la CAT. Par conséquent, *Paronychia argentea* est capable de réduire la colite ulcéreuse et les maladies inflammatoires par ses capacités antioxydantes comme le balayage des radicaux libres et l'inhibition de la peroxydation lipidique, ainsi que l'activation des enzymes antioxydantes.

L'analyse en microscopie optique nous a permis d'évaluer les atteintes histologiques au niveau du côlon. Au cours de notre étude, l'atteinte histologique induite par l'acide acétique est bien marquée. Dans ces conditions, l'injection de l'extrait méthanolique de *Paronychia argentea* a permis de protéger la muqueuse colique contre ces dommages.

En conclusion, ces résultats suggèrent que *Paronychia argentea* possède une activité antioxydante et une propriété anti-inflammatoire très importantes. Elle peut donc servir comme un excellent traitement naturel pour de nombreuses maladies comme la colite ulcéreuse.

Par conséquent, des études plus approfondies sont nécessaires pour: (i) isoler, caractériser et identifier les composés actifs présents dans les extraits de la plante, (ii) étudier la toxicité de ces composés actifs, et (iii) examiner les activités biologiques de chaque composé par des techniques *in-vitro* et *in-vivo*, et la possibilité de leurs utilisations pharmaceutiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelwahab S.I., Mariod A.A., Mohamed Elhassan Taha M., Faridah Q.Z., Abdelmageed A.H.A., Khamis S., Sivasothy Y., Awang K. (2014). Chemical composition and antioxidant properties of the essential oil of *Cinnamomum altissimum* Kosterm. (Lauraceae). *Arabian Journal of Chemistry* 1-5.
- Abdullahi A., Hamzah RU, Jigam AA, Yahya A, Kabiru AY, Muhammad H, Sakpe S, Adefolalu FS, Isah MC, Kolo MZ (2012). Inhibitory activity of xanthine oxidase by fractions *Crateva adansonii*. *Journal of Acute Disease*, 126-129.
- Abramovič H. (2015). Chapter 93-Antioxidant properties of hydroxycinnamic acid derivatives: A focus on biochemistry, physicochemical parameters, reactive species, and biomolecular interactions. *Coffee in Health and Disease Prevention*. Elsevier.
- Afifi F.U., Al-Khalidi B., Khalil E. (2005). Studies on the in vivo hypoglycemic activities of two medicinal plants used in the treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine following intranasal administration. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 314-318.
- Ahmed I.A., Mikail M.A., Bin Ibrahim M., Bin Hazali N., Rasad M.S.B.A., Ghani R. A., *et al.* (2015). Antioxidant activity and phenolic profile of various morphological parts of underutilised *Baccaurea angulata* fruit. *Food Chemistry* 172, 778-787.
- Aiassa V., Zoppi A., Albesa I., Longhi M.R. (2015). Inclusion complexes of chloramphenicol with β -cyclodextrin and aminoacids as a way to increase drug solubility and modulate ROS production. *Carbohydrate Polymers* 121, 320-327.
- Al-Bakri A.G., Afifi F.U. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods* 68, 19-25.
- Alessandri A.L., Sousa L.P. , Lucas C.D. , Rossi A.G. , Pinho V., Teixeira M.M. (2013). Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics* 139, 189-212.
- Allali H., Benmehdi H., Dib M.A., Tabti B., Ghalem S., Benabadji N. (2008). Phytotherapy of diabetes in west Algeria. *Asian Journal Chemistry* 20, 2701-2710.

- Alvarez-Suarez J.M., Dekanski D., Ristic S., Radonjic N.V., Petronijevic N.D., Giampieri F., Astolfi P., Gonzalez-Paramas A.M., Santos-Buelga C., Tulipani S., Quiles J.L., Mezzetti B., Battino M. (2011). Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. *PLoS One* 6, 258-278.
- Amessis-Ouchemoukh N., Madani K., Falé P.L.V., Serralheiro M.L., Araújo M.E.M. (2014). Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* 53, 6-15.
- Andersen O.M., Jordheim M. (2010). Chemistry of flavonoid-based colors in plants. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* 3, 547-614.
- Anhê F.F., Desjardins Y., Pilon G., Dudonné S., Genovese M.I., Lajolo F.M., Marette A. (2013). Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. *Pharma. Nutrition* 1, 105-114.
- Arapitsas P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry* 135, 1708-1717.
- Asgarpanah J., Roohi E. (2012). Phytochemistry and pharmacological properties of *Equisetum arvense* L. *Journal of Medicinal Plants Research* 6, 3689-3693.
- Aslan A., Güllüce M., Sökmen M., Adigüzel A., Sahin F., Özkan H. (2006). Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella pulla*. *Pharm. Biol.* 44, 247-252.
- Atmani D., Benboubetra M., Harrison H. (2004). Goat's milk xanthine oxidoreductase is grossly deficient in molybdenum. *J. Dairy Res.* 71, 7-13.
- Aydogan U., Durmaz E., Ercan C.M., Eken A., Ulutas O.K., Kavuk S., et al. (2013). Effects of smoking during pregnancy on DNA damage and ROS level consequences in maternal and newborns' blood. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 64, 35-46.
- Baghiani A., Ameni D., Boumerfeg S., Adjadj M., Djarmouni M., Charef N., Khennouf S., Arrar L. (2012). Studies of Antioxidants and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of

Root and Aerial Parts of Medicinal Plant *Capparis Spinosa* L. *American Journal of Medicine and Medical Sciences* 2, 25-32.

Baghiani A., Arrar L., Benboubetra M. (2002). Purification and comparative kinetic study of the milk molybdoflavoenzyme, xanthine oxidoreductase, from different species. In "Chapman S., Perham R. Scrutton N. and Weber R. (Eds.), Flavins and flavoproteins 2002". Agency for Scientific Publications, Berlin. pp: 837-844.

Baghiani A., Boumerfeg S., Adjadj M., Ameni D., Djarmouni M., Khelifi Touhami F., Charef N., Khennouf S., Arrar L. (2011). Antioxidants, Free Radicals Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of *Ajuga iva* L. Extracts. *Free Radicals and Antioxidants* 1, 20-29.

Baghiani A., Boumerfeg S., Belkhiri F., Khennouf S., Charef N., Harzallah D., Arrar L., Abdel-Wahhab M. (2010). Antioxidant and radical scavenging properties of *Carthamus caeruleus* L. extracts grow wild in the Algeria flora. *The Comunicata Scientiae* 1, 128-136.

Baghiani A., Harrison R., Benboubetra M. (2003). Purification and partial characterization of camel milk xanthine oxidoreductase. *Archives of Physiology and Biochemistry* 111, 407-414.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunete C., Dine T., Vasseur J., Gazin J.C., Pinkas M., Luycky M., Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneim Forsh / Drug Res.* 1-6.

Balan T., Sani M.H.M., Ahmad S.H.M., Suppaiah V., Mohtarrudin N., Jamaludin F., Zakaria Z.A. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities contribute to the prophylactic effect of semi-purified fractions obtained from the crude methanol extract of *Muntingia calabura* leaves against gastric ulceration in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 1-15.

Barrera G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol.* 2012, 1-21.

Barriere C., Centeno D., Lebert A., Leroy-Setrin S., Berdague J.L., Talon R. (2001). Roles of superoxide dismutase and catalase of *Staphylococcus xylosus* in the inhibition of linoleic acid oxidation. *FEMS Microbiology Letters* 201, 181-185.

- Battelli M.G., Bolognesi A., Polito L. (2014a). Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842, 1502-1517.
- Battelli M.G., Polito L., Bolognesi A. (2014b). Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress. *Atherosclerosis* 237, 562-567.
- Belarbi Z., Gamby J., Makhloufi L., Scotta B., Tribollet B. (2014). Inhibition of calciumcarbonate precipitation by aqueous extracts of *Paronychia argentea*. *J. Cryst. Growth* 386, 208-214.
- Benboubetra M., Baghiani A., Atmani D., Harrison H. (2004). Physiochemical and kinetic properties of purified sheep's milk xanthine oxidoreductase. *J. Dairy Sci.* 87, 1580-1584.
- Benzie I.F.F., Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Anal. biochem.* 239, 70-76.
- Beta T., Nam S., Dexter J.E., Sapirstein H.D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem.* 82, 390-393.
- Bitiren M., Karakilcik A.Z., Zerin M., Ozardali I., Selek S., Nazligul Y. *et al.* (2010). Protective effects of selenium and vitamin E combination on experimental colitis in blood plasma and colon of rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 136, 87-95.
- Block K., Gorin Y. (2012). Aiding and abetting roles of NOX oxidases in cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* 12, 627-637.
- Boban M, Modun D. (2010). Uric acid and antioxidant effects of wine. *Croat Med. J.* 51, 16-22.
- Böhm F., Edge R., Truscott G. (2012). Interactions of dietary carotenoids with activated (singlet) oxygen and free radicals: Potential effects for human health. *Molecular Nutrition & Food Research* 56, 205-216.
- Bolling B.W., Dolnikowski G., Blumberg J.B., Chen C.Y.O. (2010). Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. *Food Chemistry* 122, 819-825.

- Boopala Bhagavan N., Arunachalam S., Dhasarathan P., Kannan N.D. (2013). Evaluation of anti inflammatory activity of *Indigofera aspalathoides* Vahl in Swiss albino mice. *Journal of Pharmacy Research* 6, 350-354.
- Bordt E.A., Polster B.M. (2014). NADPH oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in proinflammatory microglial activation: a bipartisan affair? *Free Radical Biology and Medicine* 76, 34-46.
- Bouanani S., Henchiri C., Migianu-Griffoni E., Aouf N., Lecouvey M. (2010). Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in experimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 129, 38-45.
- Boudjelal A., Henchiri C., Sari M., Sarri D., Hendel N., Benkhaled A., Ruberto G.. (2013). Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *Journal of Ethnopharmacology* 148, 395-402.
- Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni ., Adjadj M., Belkhiri F., Charef N., Khennouf S., Arrar L. (2012). Inhibitory Activity on Xanthine Oxidase and Antioxidant Properties of *Teucrium polium* L. Extracts. *Chinese Medicine* 3, 30-41.
- Boumerfeg S., Baghiani A., Messaoudi D., Khennouf S., Arrar L. (2009). Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L root extracts. *Phytother. Res.* 23, 283-288.
- Braca A. Bader A. Siciliano T., De Tommasi N. (2008). Secondary metabolites from *Paronychia argentea*. *Magn. Reson. Chem.* 46, 88-93.
- Bray R.C. (1975). Molybdenum iron-sulfer flavin hydroxylases and related enzymes. In " Boyer P.D (Eds.), The enzymes" 3rd Ed. *Academic Press, New York*, 299-419.
- Brickell C. (2003). (Editor-in-chief): *RHS A-Z Encyclopedia of Garden Plants*. Third edition. Dorling Kindersley, London, ISBN 0-7513-3738-2. (Angl.).
- Buckley C.D., Gilroy D.W., Serhan C.N. (2014). Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity* 40, 315-327.
- Calderon A.J., Wener M.H. (2012). Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein. *Hospital Medicine Clinics* 1, e313-e337.

- Cantu-Medellin N., Kelley E.E. (2013a). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide* 34, 19-26.
- Cantu-Medellin N., Kelley E.E. (2013b). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology* 1, 353-358.
- Capiralla H., Vingtdoux V., Zhao H., Sankowski R., Al-Abed Y., Davies P., Marambaud P. (2012). Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and Abeta-mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-kappaB/STAT signaling cascade. *Journal of Neurochemistry* 120, 461-472.
- Cardona F., Andrés-Lacueva C., Tulipani S., Tinahones F.J., Queipo-Ortuño M.I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24, 1415-1422.
- Cazarin C.B.B., da Silva J.K., Colomeu T.C., Batista Â.G., Meletti L.M.M., Paschoal J.A.R., Junior S.B., Braga P.A.C., Reyes F.G.R., Augusto F., de Meirelles L.R., Zollner R.L., Júnior M.R.M. (2015). Intake of *Passiflora edulis* leaf extract improves antioxidant and anti-inflammatory status in rats with 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis. *Journal of Functional Foods* 17, 575-586.
- Chagnon A. (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Concours Méd.* 122, 2256-2258.
- Chanet A., Milenkovic D., Deval C., Potier M., Constans J., Mazur A., Bennetau-Pelissero C., Morand C., Berard A.M. (2012a). Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 469-477.
- Chanet A., Milenkovic D., Manach C., Mazur A., Morand C. (2012b). Citrus flavanones: what is their role in cardiovascular protection?. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 8809-8822.
- Chang T.N., Huang S.S., Chang Y.S., Chang C.I., Yang H.L., Deng J.S., Kou H., Huang G.J., (2011). Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of taraxeren-3-one from *Diospyros maritima* in mice. *J. Agric. Food Chem.* 59, 9112-9119.

- Charles N.S., Peter A.W. and Derek W.G. (2010). Fundamentals of Inflammation. *Cambridge University Press*, 2-3.
- Chaussemier M., Pourmohtasham E., Gelus D., Pécoule N., Perrot H., Lédion J., Cheap-Charpentier H., Horner O. (2015). State of art of natural inhibitors of calcium carbonate scaling. A review article. *Desalination* 356, 47-55.
- Chu H.-Q., Li J., Huang H.-P., Hao W.-D., Duan L.-P., Wei X.-T. (2015). Protective effects of tranilast on oxazolone-induced rat colitis through a mast cell-dependent pathway. *Digestive and Liver Disease* 1-10.
- Clairborne A. (1985). Catalase activity. In handbook of method for oxygen radical Research. Green world, R.A.ed: Boca Raton .Fla CRC press, 283-284.
- Cooper H.S., Murthy S.N., Shah R.S., Sedergran D.J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab. Invest.* 69, 238-249.
- Cordeiro R.M. (2014). Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: distribution, mobility and permeation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1838, 438-444.
- Corsonello A., Pedone C., Battaglia S., Paglino G., Bellia V., Incalzi R.A. (2011). C-reactive protein (CRP) and erythrocyte sedimentation rate (ESR) as inflammation markers in elderly patients with stable chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Archives of Gerontology and Geriatrics* 53, 190-195.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van-Poel B., Pieters L., Vlietinck A.J., Vanden Berghe D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61, 71-76.
- Crespo I., García-Mediavilla M.V., Almar M., González P., Tuñón M.J., Sánchez-Campos S., *et al.* (2008). Differential effects of dietary flavonoids on reactive oxygen and nitrogen species generation and changes in antioxidant enzyme expression induced by proinflammatory cytokines in Chang Liver cells. *Food Chem. Toxicol.* 46, 1555-1569.
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26, 1001-1043.

- Cuong T.D., Hung T.M., Lee J.-S., Weon K.-Y., Woo M.H., Min B.S. (2015). Anti-inflammatory activity of phenolic compounds from the whole plant of *Scutellaria indica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25, 1129-1134.
- Curvers J., Kooren J., Laan M., van Lierop E., van de Kerkhof D., Scharnhorst V.; Herruer M. (2010). Evaluation of the Ves-Matic Cube 200 Erythrocyte Sedimentation Method Comparison With Westergren-Based Methods. *American Journal of Clinical Pathology* 134, 653-660.
- Custódia L., Patarra J., Alberício Fernando, Neng N., Nogueira J.M.F., Romano A. (2015). Phenolic composition, antioxidant potential and in vitro inhibitory activity of leaves and acorns of *Quercus suber* on key enzymes relevant for hyperglycemia and Alzheimer's disease. *Industrial Crops and Products* 64, 45-51.
- De Grey A.D. (2002). HO₂[•]: the forgotten radical. *DNA Cell. Biol.* 21, 251-257.
- deCortes Sanchez-Mata M. (2013). Lycopene: A review of chemical and biological activity related to beneficial health effects. *Studies in Natural Products Chemistry* 40, 383.
- Deshmukh C.D., Veeresh B., Pawar A.T. (2010). Protective effect of *Embllica officinalis* fruit extract on acetic acid induced colitis in rats. *J. Herb. Med. Toxicol.* 4, 83-87.
- Ding C. (2002). Do NSAIDs affect the progression of osteoarthritis?. *Inflammation* 26, 139-142.
- Dodda D., Chhajed R., Mishra J. (2014). Protective effect of quercetin against acetic acid induced inflammatory bowel disease (IBD) like symptoms in rats: Possible morphological and biochemical alterations. *Pharmacological Reports* 66, 169-173.
- Donaghy L., Hong H.K., Jauzein C., Choi K.S. (2015). The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish & Shellfish Immunology* 42, 91-97.
- Dorward D.A., Lucas C.D., Rossi A.G., Haslett C., Dhaliwal K. (2012). Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology & Therapeutics* 135, 182-199.

- Droge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.
- Drose S., Brandt U. (2012). Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 748, 145-169.
- Du J., Cullen J.J., Buettner G.R. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1826, 443-457.
- Dugas A.J., Castaneda-Acosta J., Bonin G.C., Price K.L., Fischer N.H., Winston G.W. (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod.* 63, 327-331.
- Dupuy A.M., Terrier N., Sénécal L., Morena M., Leray H., Canaud B., Cristol J.P. (2003). La CRP est-elle plus qu'un marqueur de l'inflammation?. *Néphrologie* 24 , 337-341.
- Dzoyem J.P., Eloff J.N. (2015). Anti-inflammatory, anticholinesterase and antioxidant activity of leaf extracts of twelve plants used traditionally to alleviate pain and inflammation in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 160, 194-201.
- El Assar M., Angulo J., Rodríguez-Manãs L. (2013). Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 380-401.
- El-Gowell H.M., Saad E.I., Abdel-Galil A.-G.A., Ibrahim E.R. (2015). Co-administration of α -lipoic acid and cyclosporine aggravates colon ulceration of acetic acid-induced ulcerative colitis via facilitation of NO/COX-2/miR-210 cascade. *Toxicology and Applied Pharmacology* 288, 300-312.
- Ellman G. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- El-Medany A., Mahgoub A., Mustafa A., Arafa M., Morsi M. (2005). The effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib, on experimental colitis induced by acetic acid in rats. *European Journal of Pharmacology* 507, 291-299.
- Erhardt W., Götz E., Bödeker N., Seybold S. (2008). *Der große Zander*. Eugen Ulmer K.G., Stuttgart, ISBN 978-3-8001-5406-7. (All.).

- Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. (2005). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?. *Diabetes* 52, 1-8.
- Fahraeus R. (1921). The suspension-ability of the blood. *Acta. Med. Scand.* 55, 158.
- Faruque L.I., Ehteshami-Afshar A., Wiebe N., Tjosvold L., Homik J., Tonelli M. (2013). A systematic review and meta-analysis on the safety and efficacy of febuxostat versus allopurinol in chronic gout. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 43, 367-375.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique* 108 - 115.
- Fenercioglu A.K., Saler T., Genc E., Sabuncu H., Altuntas Y. (2010). The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *Journal of Endocrinological Investigation* 33, 118-124.
- Ferreira A., Proença C., Serralheiro M.L.M., Araújo M.E.M. (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 31-37.
- Francischetti I., Moreno J.B., Scholz M., Yoshida W.B. (2010). Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* 25, 575-584.
- Fransen M., Nordgren M., Wang B., Apanasets O. (2012). Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochim Biophys Acta BBA Mol. Basis Dis.* 1822, 1363-1373.
- Gandhi S., Abramov A.Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neuro-degeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-11.
- Ganesan K., Suresh Kumar K., Subba Rao P.V. (2011). Comparative assessment of antioxidant activity in three edible species of green seaweed, *Enteromorpha* from Okha, Northwest coast of India. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 73-78.

- Ghatule R.R., Goel S., Gautam M.K., Singh A., Joshi V.K., Goel R.K. (2012). Effect of *Azadirachta indica* leaves extract on acetic acid-induced colitis in rats: Role of antioxidants, free radicals and myeloperoxidase. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* S651-S657.
- Girard A., Madani S., Boukourt F., Cherkaoui-Malki M., Belleville J., Prost J. (2006). Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition* 22, 758-766.
- Gonçalves S., Gomes D., Costa P., Romano A. (2013). The phenolic content and antioxidant activity of infusions from Mediterranean medicinal plants. *Industrial Crops and Products* 43, 465-471.
- Gornall A.G., Bardawill C.S., David M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the reaction biuret. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
- Guedes M., Esperança A., Pereira A.C., Rego C. (2014). What is the effect on cardiovascular events of reducing hyperuricemia with allopurinol? An evidence-based review. *Rev. Port. Cardiol.* 33, 727-732.
- Guo M., Perez C., Wei Y., Rapoza E., Su G., BouAbdallah F., Chasteen N.D. (2007). Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. *Dalton Trans.* 21, 4951-4961.
- Gupta R.A., Motiwala M.N., Dumore N.G., Danao K.R., Ganjare A.B. (2015). Effect of piperine on inhibition of FFA induced TLR4 mediated inflammation and amelioration of acetic acid induced ulcerative colitis in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 164, 239-246.
- Hajlaoui H., Mighri H., Noumi E., Snoussi M., Trabelsi N., Ksouri R. *et al.* (2010). Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* L. essential oil: a high effectiveness against *Vibrio spp.* Strains. *Food and Chemical Toxicology* 48, 2186-2192.
- Hamdan I.I., Afifi F.U. (2004). Studies on the in vitro and in vivo hypoglycemic activities of some medicinal plants used in treatment of diabetes in Jordanian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 117-121.

- Hanhineva K, Törrönen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkänen H, *et al.* (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 1365-1402.
- Hariharan P., Kabrhel C. (2011). SENSITIVITY OF ERYTHROCYTE SEDIMENTATION RATE AND C-REACTIVE PROTEIN FOR THE EXCLUSION OF SEPTIC ARTHRITIS IN EMERGENCY DEPARTMENT PATIENTS. *The Journal of Emergency Medicine* 40, 428-431.
- Hatwalne M.S. (2012). Free radical scavengers in anaesthesiology and critical care. *Indian Journal of Anaesthesia* 56, 227-233.
- Headland S.E., Norling L.V. (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology* 1-12.
- Henzen C. (2003). Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum médical suisse* 19, 442-446.
- Holbrook N.J., Ikeyama S. (2002). Age-related decline in cellular response to oxidative stress: links to growth factor signaling pathways with common defects. *Biochem. Pharmacol.* 64, 999-1005.
- Holley A.K. , Miao L., StClair D.K., StClair W.H. (2014). Redox-Modulated Phenomena and Radiation Therapy: The Central Role of Superoxide Dismutases. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1567-1589.
- Howcroft T.K., Campisi J., Louis G.B., Smith M.T., Wise B., Wyss-Coray T., Augustine A.D., Mcelhaney J.E., Kohanski R., Sierra F. (2013). The role of inflammation in age-related disease. *Aging (Albany NY)* 5, 84-93.
- Hurd T.R., DeGennaro M., Lehmann R. (2012). Redox regulation of cell migration and adhesion. *Trends Cell Biol.* 22, 107-115.
- Iyer M.K., Nayak R., Colah R., Chattopadhyay S. (2013). Attenuation of oxidative hemolysis of human red blood cells by the natural phenolic compound, allylpyrocatechol. *Free Radical Research* 47, 710-717.

- Jaén J.A., González L., Vargas A., Olave G. (2003). Gallic acid, ellagic acid and pyrogallol reaction with metallic iron. *Hyperfine Interact* 148/149, 227-235.
- Jagtap A.G., Niphadkar P.V., Phadke A.S. (2011). Protective effect of aqueous extract of *Bombax malabaricum* DC on experimental models of inflammatory bowel disease in rats and mice. *Indian J. Exp. Biol.* 49, 343-351.
- Jayaprakasha G.K., Singh R.P., Sakariah K.K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry* 73, 285-290.
- Jayasena T., Poljak A., Smythe G., Braidy N., Münch G., Sachdev P. (2013). The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's Disease. *Ageing Research Reviews* 12, 867-883.
- Jena G., Trivedi P.P., Sandala B. (2012). Oxidative stress in ulcerative colitis: an old concept but a new concern. *Free Radic. Res.* 46, 1339-1345.
- Jennings C.G., Mackenzie I.S., Flynn R., Ford I., Nuki G., De Caterina R., Riches P.L., Ralston S.H., MacDonald T.M. (2014). Up-titration of allopurinol in patients with gout. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 44, 25-30.
- Jiménez N., Carrillo-Hormaza L., Pujol A., Álzate F., Osorio E., Lara-Guzman O. (2015). Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia. *Industrial Crops and Products* 70, 272-279.
- Jin J. (2014). JAMA patient page. Inflammatory bowel disease. *J. Am. Med. Assoc.* 311, 2034.
- Jomova K., Vondrakova D., Lawson M., Valko M., (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry* 345, 91-104.
- Jomova K., Valko M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65-87.
- Kainth M.K., Gigliotti F. (2014). Simultaneous Testing of Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein: Increased Expenditure without Demonstrable Benefit. *THE JOURNAL OF PEDIATRICS* 165, 625-627.

- Kalogeropoulos N., Yanni A.E., Koutrotsios G., Aloupi M. (2013). Bioactive micro-constituents and antioxidant properties of wild edible mushrooms from the island of Lesbos, Greece. *Food Chem. Toxicol.* 55, 378-385.
- Kandhare AD, Raygude KS, Ghosh P, Ghule AE, Gosavi TP, Badole SL. *et al.* (2012). Effect of hydroalcoholic extract of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. leaves in experimental colitis in rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 337-344.
- Kannan N., Guruvayoorappan C. (2013). Protective effect of *Bauhinia tomentosa* on acetic acid induced ulcerative colitis by regulating antioxidant and inflammatory mediators. *International Immunopharmacology* 16, 57-66.
- Karbinger M.S., Sierra L., Minahk C., Fonio M.C., Bruno M.P., Jerez S. (2013). The role of oxidative stress in alterations of hematological parameters and inflammatory markers induced by early hypercholesterolemia. *Life Sciences* 93, 503-508.
- Kardeh S., Ashkani-Esfahani S., Alizadeh A.M. (2014). Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *European Journal of Pharmacology* 735, 150-168.
- Kelley E.E., Khoo N.K.H.H., Hundley N.J., Malik U.Z., Freeman B.A., Tarpey M.M. (2010). Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 493-498.
- Kelley E.E. (2015). A new paradigm for XOR-catalyzed reactive species generation in the endothelium. *Pharmacological Reports* 1-6.
- Khan M.K., Huma Z.E., Dangles O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 33, 85-104.
- Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, *et al.* (2010). Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PLoS ONE* 5, 953-959.
- Khled-Khodja N., Boulekbache-Makhlouf L., Madani K. (2014). Antioxidant capacity of crude extracts and their solvent fractions of selected Algerian Lamiaceae. *Industrial Crops and Products* 52, 177-182.

- Khelifi R., Hamza-Chaffai A. (2010). Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 248, 71-88.
- Khor B., Gardet A., Xavier R.J. (2011). Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307-317.
- Kilani-Jaziri S., Ghedira Z., Nasr N., Krifa M., Ghedira K., Franca Dijoux M.G., Ghedira-Chekir L. (2014). Evaluation of in vitro antioxidant and apoptotic activities of *Cyperus rotundus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 105-112.
- Klaus A., Kozarski M., Vunduk J., Todorovic N., Jakovljevic D., Zizak Z., Pavlovic V., Levic S., Niksic M., Van Griensven L.J.L.D. (2015). Biological potential of extracts of the wild edible Basidiomycete mushroom *Grifola frondosa*. *Food Research International* 67, 272-283.
- Koheil M.A., Hussein M.A., Othman S.M., El-Haddad A. (2011). Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Moringa peregrina* Seeds. *Free Radicals and Antioxidants* 1, 49-61.
- Kohen R., Nyska A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 30, 620-650.
- Kraaij M.D., van der Kooij S.W., Reinders M.E.J., Koekkoek K., Rabelink T.J., van Kooten C., Gelderman K.A. (2011). Dexamethasone increases ROS production and T cell suppressive capacity by anti-inflammatory macrophages. *Molecular Immunology* 49, 549-557.
- Krishnan M., Jayaraj R.L., Megala J., Elangovan N. (2014). Antioxidant mediated antiulcer effect of *Eupatorium triplinerve* Vahl. against acetic acid induced ulcerative colitis in mice. *Biomedicine & Aging Pathology* 4, 153-160.
- Kruidenier L., Kuiper I., Van Duijn W., Mieremet-Ooms M.A., van Hogezaand R.A., Lamers C.B., et al. (2003). Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J. Pathol.* 201, 17-27.

- Kumar V., Abul K A., Nelson F., Richard M. (2007). Robbins Basic Pathology, 8th Edition, 20-60.
- Kundu T.K., Velayutham M., Zweier J.L. (2012). Aldehyde oxidase functions as a superoxide generating NADH oxidase: an important redox regulated pathway of cellular oxygen radical formation. *Biochemistry (Mosc)* 51, 2930-2939.
- Laan R.F., Jansen, T.L., Van Riel, P.L. (1999). Glucocorticosteroids in the management of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 38, 6-12.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Larsen B.H.V., Soelberg J., Jäger A.K. (2015). COX-1 inhibitory effect of medicinal plants of Ghana. *South African Journal of Botany* 99, 129-131.
- Lavranos G., Balla M., Tzortzopoulou A., Syriou V., Angelopoulou R. (2012). Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways. *Reproductive Toxicology* 34, 298-307.
- Le K., Chiu F., Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry* 105, 353-363.
- Lee H.-N., Surh Y.-J. (2012). Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. *Biochemical Pharmacology* 84, 1340-1350.
- Leitch A.E., Duffin R., Haslett C., Rossi A.G. (2008). Relevance of granulocyte apoptosis to resolution of inflammation at the respiratory mucosa. *Mucosal Immunol.* 1, 350-363.
- Leopoldini M., Russo N., Toscano M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 125, 288-306.
- Leza J.C., García-Bueno B., Bioque M., Arango C., Parellada M., Do K., O'Donnell P., Bernardo M. (2015). Inflammation in schizophrenia: A question of balance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 55, 612-626.

- Li D.Q., Zhao J., Li S.P. (2014). High-performance liquid chromatography coupled with post-column dual-bioactivity assay for simultaneous screening of xanthine oxidase inhibitors and free radical scavengers from complex mixture. *Journal of Chromatography A* 1345, 50-56.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Jiang Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry* 102, 771-776.
- Li J., Holbrook N.J. (2003). Common mechanisms for declines in oxidative stress tolerance and proliferation with aging. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 292-299.
- Limon-Pacheco J., Gonsbatt M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res.* 674, 137-147.
- Lin W.Q., Xie J.X., Wu X.M., Yang L., Wang H.D. (2014). Inhibition of Xanthine Oxidase Activity by *Gnaphalium affine* Extract. *Chin. Med. Sci. J.* 29, 225-230.
- Link A., Balaguer F., Goel A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology* 80, 1771-1792.
- Lioté F. (2011). Physiopathologie et traitement de l'inflammation goutteuse. *Revue du Rhumatisme* 78, S122-S128.
- Liu S., Huang H. (2014). Assessments of antioxidant effect of black tea extract and its rationals by erythrocyte haemolysis assay, plasma oxidation assay and cellular antioxidant activity (CAA) assay. *Journal of Functional Foods* 1-11.
- Liu X., Ni X.J., Shang D.W., Zhang M., Hu J.Q., Qiu C., Luo F.T., Wen Y.G. (2013). Determination of allopurinol and oxypurinol in human plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography* 941, 10-16.
- Lloyd M.M., Grima M.A., Rayner B.S., Hadfield K.A., Davies M.J., Hawkins C.L. (2013). Comparative reactivity of the myeloperoxidase-derived oxidants hypochlorous acid and hypothiocyanous acid with human coronary artery endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 1352-1362.

- Lu J.M., Yao Q., Chen C. (2013). 3,4-Dihydroxy-5-nitrobenzaldehyde (DHNB) is a potent inhibitor of xanthine oxidase: A potential therapeutic agent for treatment of hyperuricemia and gout. *Biochemical Pharmacology* 86, 1328-1337.
- Ma Y., Liu S., Huang H. (2014). Alleviation effect of heat-treated and in vitro gastrointestinal digested soymilks on AAPH-induced oxidative stress in human erythrocytes Digested soymilks alleviate oxidative stress. *Food Research International* 66, 228-234.
- MacDermott R.P. (2000). Progress in understanding the mechanisms of action of 5-aminosalicylic acid. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 3343-3345.
- Majdalawieh A.F., Fayyad M.W. (2015). Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. *International Immunopharmacology* 28, 295-304.
- Majer P., Neugart S., Krumbein A., Schreiner M., Hideg É. (2014). Singlet oxygen scavenging by leaf flavonoids contributes to sunlight acclimation in *Tilia platyphyllos*. *Environmental and Experimental Botany* 100, 1-9.
- Mandel S.A., Amit T., Weinreb O., Youdim M.B. (2011). Understanding the broad-spectrum neuroprotective action profile of green tea polyphenols in aging and neurodegenerative diseases. *Journal of Alzheimer's Disease* 25, 187-208.
- Manoj K.M., Gade S.K., Mathew L. (2010). Cytochrome P450 reductase: a harbinger of diffusible reduced oxygen species. *Plo. S. One.* 5, 13272.
- Mao R., Zou F., Yang L., Lin S., Li Y., Ma M., Yin P., Liang X., Liu J. (2015). The loss of MiR-139-5p promotes colitis-associated tumorigenesis by mediating PI3K/AKT/Wnt signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 69, 153-161.
- Markham K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification. *Academic press, London* Chap. 1 and 2, 1-113.
- Martindale J.L., Holbrook N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.* 192, 1-15.

- Maskrey B.H., Megson I.L., Whitfield P.D., Rossi A.G. (2011). Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 1001-1006.
- Masuda T., Nojima S., Miura Y., Honda S., Masuda A. (2015). An oxidative coupling product of luteolin with cysteine ester and its enhanced inhibitory activity for xanthine oxidase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1-3.
- Masuda T., Shingai Y., Takahashi C., Inai M., Miura Y., Honda S., Masuda A. (2014). Identification of a potent xanthine oxidase inhibitor from oxidation of caffeic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 69, 300-307.
- Matsuo Y., Azuma Y.-T., Kuwamura M., Kuramoto N., Nishiyama K., Yoshida N., Ikeda Y., Fujimoto Y., Nakajima H., Takeuchi T. (2015). Interleukin 19 reduces inflammation in chemically induced experimental colitis. *International Immunopharmacology* 1-8.
- McMurray C.T., Tainer J.A., (2003). Cancer, cadmium and genome integrity. *Nat. Genet.* 34, 239-241.
- McParland B.J. (2010). Nuclear Medicine Radiation Dosimetry. London: Springer-Verlag.
- Miao L., Clair D.K.S. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. *Free Radic. Bio. Med.* 47, 344-356.
- Miaol X.P., Sun X.N., Cui L.J., Cao Q.T., Zhuang G.F., Deng T.Z., Zhang D.Y. (2015). Suppressive effect of pectic polysaccharides extracted from *Rauwolfia verticillata* (Lour.) Baill.var.hainanensis Tsiang on inflammation by regulation of NF-KB pathway and interleukin-17 in mice with dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis. *Asian Pacific journal of Tropical Medicine* 147-152.
- Minaiyan M., Hajhashemi V., Rabbani M., Fattahian E., Mahzouni P. (2015). Evaluation of anti-colitic effect of fluvoxamine against acetic acid-induced colitis in normal and reserpinized depressed rats. *European Journal of Pharmacology* 746, 293-300.
- Misra H.P., Fridovich I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.

- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 26, 211-219.
- Moniczewski A., Gawlik M., Smaga I., Niedzielska E., Krzek J., Przegaliński E., Pera J. Filip M. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacological Reports* 67, 560-568.
- Mukwevho E., Ferreira Z., Ayeleso A. (2014). Potential Role of Sulfur-Containing Antioxidant Systems in Highly Oxidative Environments. *Molecules* 19, 19376-19389.
- Muster D. (2005). Médicaments de l'inflammation. *EMC-Stomatologie* 1, 21-29.
- Muzembo B.A., Deguchi Y., Ngatu N.R., Eitoku M., Hirota R., Suganuma N. (2015). Selenium and exposure to fibrogenic mineral dust: A mini-review. *Environment International* 77, 16-24.
- Nana H.M., Ngane R.A.N., Kuate J.R., Mogtomo L.M.K., Tamokou J.D., Ndifor F., Mouokeu R.S., Etame R.M.E., Biyiti L., Zollo P.H.A. (2011). Acute and sub-acute toxicity of the methanolic extract of *Pteleopsis hylodendron* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 70-76.
- Nanda B.L., Nataraju A., Rajesh R., Rangappa K.S., Shekar M.A., Vishwanath B.S. (2007). PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by antioxidants – a new role as anti-inflammatory molecule. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 765-777.
- Nathan C, Ding A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell* 140, 871-882.
- Nawash O., Shudiefat M., Al-Tabini R., Al-Khalidi K. (2013). Ethnobotanical study of medicinal plants commonly used by local bedouins in the badia region of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology* 148, 921-925.
- Nias A.H.W. (1998). An Introduction to Radiobiology. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd.
- Nicolas J.-F., Florence C. Jean T. (2001). Immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. *John Libbey Eurotext* 2001, 55-58.

- Niu X., Fan T., Li W., Huang H., Zhang Y., Xing W. (2013). Protective effect of sanguinarine against acetic acid-induced ulcerative colitis in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 267, 256-265.
- Niu X., Zhang H., Li W., Wang Y., Mu Q., Wang X., He Z., Yao H. (2015). Protective effect of cavidine on acetic acid-induced murine colitis via regulating antioxidant, cytokine profile and NF- κ B signal transduction pathways. *Chemico-Biological Interactions* 239, 34-45.
- Nordberg J., Arnér E.S.J. (2001). REACTIVE OXYGEN SPECIES, ANTIOXIDANTS, AND THE MAMMALIAN THIOREDOXIN SYSTEM. *Free Radical Biology & Medicine* 31, 1287-1312.
- Nordgren M., Fransen M. (2014). Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie* 98, 56-62.
- Novais H.M., Santos I., Mendes S., Pinto-Gomes C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida natural park. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 183-195.
- Nowicka B., Kruk J. (2012). Plastoquinol is more active than α -tocopherol in singlet oxygen scavenging during high light stress of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1817, 389-394.
- Okamoto K., Kondo S., and Nishino T. (2013). A New-Generation Uric Acid Production Inhibitor: Febuxostat. *Analogue-based Drug Discovery III*, First Edition. 365-376.
- Okhawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351-358.
- Oliveira L.D.L.D., Carvalho M.V.D., Melo L. (2014). Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. *Revista Ceres* 61,764-779.
- Oroian M., Escriche I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International* 74, 10-36.
- Ou B., Huang D., Hampsch-Woodill M., Flanagan J.A. Deemer E.K. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance

- Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3122-3128.
- Ourique da Silva F., Tramonte V.L.C.G., Parisenti J., Lima-Garcia J.F., Maraschin M., da Silva E.L. (2015). Litopenaeus vannamei muscle carotenoids versus astaxanthin: A comparison of antioxidant activity and in vitro protective effects against lipid peroxidation. *Food Bioscience* 9, 12-19.
- Paital B., Chainy G.B.N. (2014). Effects of temperature on complexes I and II mediated respiration, ROS generation and oxidative stress status in isolated gill mitochondria of the mud crab *Scylla serrata*. *Journal of Thermal Biology* 41, 104-111.
- Pandurangan A. K., Mohebbali N., Mohd.Esa N., Looi C.Y., Ismail S., Saadatdoust Z. (2015). Gallic acid suppresses inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice: Possible mechanisms. *International Immunopharmacology* 28, 1034-1043.
- Paraje M.G., Barnes A.I., Albesa I. (2005). An *Enterobacter cloacae* toxin able to generate oxidative stress and to provoke dose-dependent lysis of leukocytes. *International Journal of Medical Microbiology* 295, 109-116.
- Park M.H., Kim D.H., Lee E.K., Kim N. D., Im D.S., Lee J., Yu B.P., Chung H.Y. (2014). Age-related inflammation and insulin resistance: a review of their intricate interdependency. *Arch. Pharm. Res.* 37, 1507-1514.
- Pasinetti G.M., Wang J., Ho L., Zhao W., Dubner L. (2015). Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852, 1202-1208.
- Patil M.V.K., Kandhare A.D., Bhise S.D. (2012). Effect of aqueous extract of *Cucumis sativus* Linn. fruit in ulcerative colitis in laboratory animals. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S962-S969.
- Peran L., Camuesco D., Comalada M., Nieto A., Concha A., Adrio J.L., et al. (2006). *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int. J. Colorectal Dis.* 21, 737-746.

- Perretti G., Troilo A., Bravi E., Marconi O., Galgano F., Fantozzi, P. (2013). Production of a lycopene-enriched fraction from tomato pomace using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* 82, 177-182.
- Persson T., Popescu B.O., Cedazo-Minguez A. (2014). Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-11.
- Phruksanan W., Yibchok-anun S., Adisakwattana S. (2014). Protection of *Clitoria ternatea* flower petal extract against free radical-induced hemolysis and oxidative damage in canine erythrocytes. *Research in Veterinary Science* 97, 358-364.
- Pisoschi A.M., Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 97, 55-74.
- Poljsak B., Milisav I. (2013). Aging, Oxidative Stress and Antioxidants. Chapter 14. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants*, 331-353.
- Poljsak B., Šuput D., Milisav I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-11.
- Pradeep P.M., Sreerama Y.N. (2015). Impact of processing on the phenolic profiles of small millets: Evaluation of their antioxidant and enzyme inhibitory properties associated with hyperglycemia. *Food Chemistry* 169, 455-463.
- Prieto-Moure B., Carabén-Redaño A., Aliena-Valero A., Cejalvo D., Toledo A.H., Flores-Bellver M., Martínez-Gil N., Toledo-Pereyra L.H., Lloris Carsí J.M. (2014). Allopurinol in Renal Ischemia. *Journal of Investigative Surgery* 27, 304-316.
- Prin L, Hachulla E, Hennache B, Bonnotte B, Dubucquoi S, Abbal M, Faure G, Bouletreau P. (2009). Réaction inflammatoire. *Inflammation documents/Immunology* 1.
- Prior R.L., Wu X., Schaich K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290-4302.
- Puddu P., Puddu G.M., Cravero E., Vizioli L., Muscari A. (2012). The relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction, and cardiovascular diseases: Molecular mechanisms and clinical implications. *Journal of Cardiology* 59, 235-242.

- Pulido R., Bravo L., Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3369-3402.
- Quiñones M., Miguel M., Aleixandre A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacological Research* 68, 125-131.
- Rachmilewitz D., Karmeli F., Takabayashi K., Hayashi T., Leider-Trejo L., Lee J., Leoni L.M., Raz E. (2002). Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology* 122, 1428-1441.
- Raedschelders K., Ansley D.M., Chen D.D.Y. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics* 133, 230-255.
- Ramel F., Birtic S., Ginies C., Soubigou-Taconnat L., Triantaphylidès C., Havaux M. (2012). Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 5535-5540.
- Raymondjean M. (2007). LES Mecanismes de L'inflammation Periphérique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 389, 21-28.
- Reinhart W.H. (2006). Erythrocyte sedimentation rate more than an old fashion?. *Ther. Umsch.* 63, 108-112.
- Repetto M., Semprine J., Boveris A. (2012). *Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: Lipid peroxidation.* Catala A, editor, In.Tech.
- Robak J., Gryglewski R.J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* 37, 837-841.
- Rodrigo R., Miranda A., Vergara L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta* 412, 410-424.
- Routray W., Orsat V. (2014). Variation of phenolic profile and antioxidant activity of North American highbush blueberry leaves with variation of time of harvest and cultivar. *Industrial Crops and Products* 62, 147-155.

- Sait S., Hamri-Zeghichi S., Boulekbache-Makhlouf L., Madani K., Rigou P., Brighenti V., Prencipe F.P., Benvenuti S., Pellati F. (2015). HPLC-UV/DAD and ESI-MSⁿ analysis of flavonoids and antioxidant activity of an Algerian medicinal plant: *Paronychia argentea* Lam. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 111, 231-240.
- Saito S., Lin Y.C., Tsai M.H., Lin C.S., Murayama Y., Sato R., Yokoyama K.K. (2015). Emerging roles of hypoxia-inducible factors and reactive oxygen species in cancer and pluripotent stem cells. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 31, 279-286.
- Samaniego-Sánchez C., Quesada-Granados J.J., de la Serrana H.L.G., López-Martínez M.C. (2010). β -Carotene, squalene and waxes determined by chromatographic method in picual extra virgin olive oil obtained by a new cold extraction system. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 671-676.
- Sánchez-Vioque R., Polissiou M., Astraka K., Mozos-Pascual M. de los, Tarantilis P., Herraiz-Peñalver D., Santana-Méridas O. (2013). Polyphenol composition and antioxidant and metal chelating activities of the solid residues from the essential oil industry. *Industrial Crops and Products* 49, 150-159.
- Santangelo C., Vari R., Scazzocchio B., Di Benedetto R., Filesi C., Masella R., (2007). Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali Dell Istituto Superiore di Sanita* 43, 394-405.
- Saric T., Rogosic J., Zupan I., Beck R., Bosnic S., Sikic Z., et al. (2015). Anthelmintic effect of three tannin-rich Mediterranean shrubs in naturally infected sheep. *Small Ruminant Research* 123, 179-182.
- Satish Kumar C.S.V., Kondal Reddy K., Gopala Reddy A., Vinoth A., Chowdary CH S.R., Boobalan G., Rao G.S. (2015). Protective effect of *Lactobacillus plantarum* 21, a probiotic on trinitrobenzenesulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *International Immunopharmacology* 25, 504-510.
- Scoditti E., Capurso C., Capurso A., Massaro M. (2014). Vascular effects of the Mediterranean diet-Part II: Role of omega-3 fatty acids and olive oil polyphenols. *Vascular Pharmacology* 63, 127-134.

- Seifried H.E., Anderson D.E., Fisher E.I., Milner J.A. (2007). A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry* 18, 567-579.
- Serhan C. N. (2011). The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. *FASEB J.* 25, 1441-1448.
- Serhan C.N., Brain S.D., Buckley C.D., Gilroy D.W., Haslett C., O'Neill L.A., *et al.* (2007). Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* 21, 325-332.
- Servais P., Seba P. (2014). *Flore de Tilos et du Dodécanèse*, Attart.
- Sethiya N.K., Trivedi A., Mishra S. (2014). The total antioxidant content and radical scavenging investigation on 17 phytochemical from dietary plant sources used globally as functional food. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 4, 439-444.
- Shahat A.A., Marzouk M.S. (2013). Chapter 13; Tannins and related compounds from medicinal plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*. Elsevier.
- Shakeri F., Boskabady M.H. (2015). A review of the relaxant effect of various medicinal plants on tracheal smooth muscle, their possible mechanism (s) and potency. *Journal of Ethnopharmacology* 175, 528-548.
- Sid B., Verrax J., Calderon P.B. (2013). Role of oxidative stress in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease. *Free Radic. Res.* 47, 894-904.
- Smaga I., Niedzielska E., Gawlik M., Moniczewski A., Krzek J., Przegaliński E., Pera J., Filip M. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacological Reports* 67, 569-580.
- Sova M. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 12, 749-767.
- Stangenberg S., Nguyen L.T., Chen H., Al-Odat I., Killingsworth M.C., Gosnell M.E., Anwer A.G., Goldys E.M., Pollock C.A., Saad S. (2015). Oxidative stress, mitochondrial perturbations and fetal programming of renal disease induced by maternal smoking. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 64, 81-90.

- Subedi L., Timalsena S., Duwadi P., Thapa R., Paudel A., Parajuli K. (2014). Antioxidant activity and phenol and flavonoid contents of eight medicinal plants from Western Nepal. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 34, 584-590.
- Sugamura K., Keaney J.F., Jr. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radical Biology & Medicine* 51, 978-992.
- Sung C.C., Hsu Y.C., Chen C.C., Lin Y.F., Wu C.C. (2013). Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 1-15.
- Tan Y.P., Chan E.W.C. (2014). Antioxidant, antityrosinase and antibacterial properties of fresh and processed leaves of *Anacardium occidentale* and *Piper betle*. *Food Bioscience* 6, 17-23.
- Tauchen J., Doskocil I., Caffi C., Lulekal E., Marsik P., Havlik J., Van Damme P., Kokoska L. (2015). In vitro antioxidant and anti-proliferative activity of Ethiopian medicinal plant extracts. *Industrial Crops and Products* 74, 671-679.
- Tepe B., Daferera D., Sokmen A., Sokmen M. and Polissiou M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 90, 333-340.
- Terpolilli N.A., Moskowitz M.A., Plesnila N. (2012). Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 32, 1332-1346.
- Tournemelle R. (2003). Anti-inflammatoires : stratégie thérapeutique. *Prescription* 49-52.
- Valentao P., Fernandes E., Carvalho F., Andrade P.B., Seabra R.M., Bastos M.L. (2001). Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3476-3479.
- Valentao P., Fernandes E., Carvalho E., Andrade P.B., Seabra R.M., Bastos M.L. (2002). Antioxidant activity of *Hypericum androsaenum* infusion scavenging effect on superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25, 1324-1327.
- Van Hai N. (2015). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture* 446, 88-96.

- Velderrain-Rodríguez G.R., Palafox-Carlos H., Wall-Medrano,A., Ayala-Zavala J.F., Chen C.O., Robles-Sánchez M., *et al.* (2014). Phenolic compounds: Their journey after intake. *Food & Function* 5, 189-197.
- Venditti P., Di Stefano L., DiMeo S. (2013). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion* 13, 71-82.
- Vinod Prabhu V., Guruvayoorappan C. (2014). Protective effect of marine mangrove *Rhizophora apiculata* on acetic acid induced experimental colitis by regulating antioxidant enzymes, inflammatory mediators and nuclear factor-kappa B subunits. *International Immunopharmacology* 18, 124-134.
- Vorbach C., Harrison R., Capecchi M.R. (2003). Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *TRENDS in Immunology* 24, 512-517.
- Weichselbaum E., Buttriss J.L. (2010). Polyphenols in the diet. *Nutrition Bulletin* 35, 157-164.
- Weill B. ; Batteux F., Dhainaut J. (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires, Bruxelles: Eds, De Boeck Université (Paris), Chap. 1, Réaction inflammatoire, p. 11-35.
- Westergren A. (1921). Studies of the suspension stability of the blood in pulmonary tuberculosis. *Acta Medica Scandinavica, Stockholm* 54, 247-282.
- Winterbourn C.C. (2013). The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 528, 3-25.
- Winterbourn C.C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1840, 730-738.
- Wong S.P., Leong L.P., William Koh J.H. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* 99, 775-783.
- Wynn T.A. (2011). Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J. Exp. Med.* 208, 1339-1350.

- Xia E.Q., Deng G.F., Guo Y.J., Li H.B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 622-646.
- Xu B.L., Zhang G.J., Ji Y.B. (2015). Active components alignment of *Gegenqinlian* decoction protects ulcerative colitis by attenuating inflammatory and oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology* 162, 253-260.
- Zama D., Meraihi Z., Tebibel S., Benayssa W., Benayache F., Benayache S., Vlietinck A.J. (2007). Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and foetus in pregnant rats: the protective role of the butanolic extract of *Paronychia argentea* L. *Ind. J. Pharmacol.* 39, 145-150.
- Zhang J., Hou X., Ahmad H., Zhang H., Zhang L., Wang T. (2014). Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chemistry* 145, 57-65.
- Zhang M., Shi J., Jiang L. (2015). Modulation of mitochondrial membrane integrity and ROS formation by high temperature in *Saccharomyces cerevisiae*. *Electronic Journal of Biotechnology* 18, 202-209.
- Zibera L., Fornasaro S., Čvorović J., Tramer F., Passamonti S. (2014). Bioavailability of flavonoids: The role of cell membrane transporters. *Polyphenols in Human Health and Disease* 1, 489-511.

ملخص

Paronychia argentea المعروفة باسم "بساط الملوك أو كسّارة الحجر"، تستعمل في الطب الشعبي الجزائري لعلاج تقرحات المعدة وأمراض البطن. و تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الخصائص المضادة للأكسدة والمضادة للإلتهابات لمستخلصات هذه النبتة. تم تحضير مختلف المستخلصات باستخدام مذيبات متزايدة القطبية. وقد أظهرت نتائج تقدير كل من عديدات الفينول الكلية والغلافونويدات أن مستخلص إيثيل الأسيتات (EaE) هو الأغنى، حيث أن محتواه من عديدات الفينول بلغ 525.79 ± 0.79 مغ مكافئ حمض الغاليك/غ من المستخلص، والذي يمثل ضعف ما يحتويه كل من المستخلص الحام (CE) ومستخلص الكلوروفورم (ChE)، أما كمية الغلافونويدات فقد بلغت 194.19 ± 8.62 مغ مكافئ *quercetin*/غ من المستخلص، وهي أكبر مما يحتويه كلا من مستخلصي ChE و CE بـ 5 مرات و 15 مرة على التوالي. كشفت نتائج اختبار النشاط المضاد للأكسدة *in-vitro* أن جميع المستخلصات كانت فعالة في كل من تثبيط الإنزيم المؤكسد للكاروتين وإزاحة جذر فوق الأكسيد الناتج عن هذا الإنزيم وذلك حسب الترتيب التالي: $CE < EaE < ChE$. في حين تبين باستخدام كلا من اختبار إزاحة جذر DPPH و اختبار منع تحلل كريات الدم الحمراء الناجم عن AAPH و اختبار FRAP، أن EaE يمتلك أعلى تأثير إزاحي للجذور الحرة ($IC_{50} = 5.3 \pm 0.03$ ميكروغرام/مل)، و أعلى نشاط مضاد لتحلل كريات الدم الحمراء ($HT_{50} = 131.66 \pm 2.99$ دقيقة)، بالإضافة إلى أكبر قوة إرجاعية ($EC_1 = 4 \text{ د} = 0.001 \pm 0.009$ غ/ل، $EC_1 = 30 \text{ د} = 0.002 \pm 0.005$ غ/ل). عند استخدام اختبار تبيض β -كاروتين، أظهر كل من EaE و ChE تأثيراً جد فعال لكبح أكسدة حمض الليبويك (84.36 ± 0.33 % و 82.60 ± 0.51 % على التوالي). وعلى عكس ذلك، وباستعمال اختبار استخلاص أيون الحديد (Fe^{2+}) أظهر CE قدرة استخلاصية ممتازة ($IC_{50} = 0.332 \pm 0.001$ مغ/مل). تم تحريض التهاب القولون التحريبي عند الفئران باستعمال حمض الأسيتيك. وقد بينت النتائج أن معاملة الفئران بالمستخلص الميثانولي لـ *Paronychia argentea* (PAME) سبب انخفاضاً معتبراً في مؤشر نشاط المرضى و وزن القولون و درجة المرض الظاهرة فيه و تركيز بروتين CRP في مصل الدم و معدل ترسيب كريات الدم الحمراء (ESR) و تركيز مركب MDA في القولون. كما أدت هذه المعاملة إلى زيادة كبيرة في طول القولون و صيغة تعداد الدم (FNS) و معدل الغلوتاثيون المختزل (GSH) و نشاط كل من إنزيمي SOD و CAT في القولون. أما بالنسبة لدراسة المقاطع النسيجية للقولون فقد أدت المعاملة إلى ظهور تقليص ملحوظ لضرر الأمعاء وتسرب الخلايا الليمفاوية لدى الفئران المعاملة، مما يدل على أن هذه النبتة أدت إلى كبح التهاب القولون الناجم عن حمض الأسيتيك. و بناء على هذه النتائج، يمكن لنبتة *Paronychia argentea* أن تستعمل كعلاج طبيعي مضاد للأكسدة و مضاد لالتهاب القولون التحريبي.

RESUME

Paronychia argentea, connue sous le nom: Bssat El-moulouk ou Kessaret Lahdjar, est utilisée dans la médecine traditionnelle en Algérie pour le traitement des ulcères gastriques et les maladies abdominales. La présente étude vise à évaluer les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des extraits de cette plante. Les différents extraits ont été préparés par l'utilisation de solvants à polarités croissantes. Les dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle (EaE) représente la fraction la plus riche en polyphénols et en flavonoïdes, avec une teneur en polyphénols (525.79 ± 0.79 mg EAG/g E) double de celles de l'extrait brut (EBr) et l'extrait chloroformique (ECh), et une teneur en flavonoïdes (194.19 ± 8.62 mg EQ/g E) 5 et 15 fois supérieur à celles trouvées dans l'ECh et l'EBr, respectivement. Les résultats de l'activité antioxydante, évaluée par plusieurs tests *in-vitro*, ont révélé que tous les extraits étaient efficaces à la fois dans l'inhibition de la xanthine oxydase et le piégeage de l'anion superoxyde produit par cette enzyme dans l'ordre suivant: $ECh > EaE > EBr$. En utilisant les tests de DPPH, d'hémolyse induite par l'AAPH et du FRAP, l'EaE semble avoir respectivement l'effet anti-radicalaire ($IC_{50} = 5.3 \pm 0.03$ μ g/mL), l'activité anti-hémolytique ($HT_{50} = 131.66 \pm 2.99$ min) et le pouvoir réducteur (EC_1 à 4 min = 0.009 ± 0.001 g/L, EC_1 à 30 min = 0.005 ± 0.002 g/L) les plus puissants. Dans le test de blanchissement du β -carotène, l'EaE et l'ECh ont présenté un excellent effet inhibiteur de l'oxydation de l'acide linoléique (84.36 ± 0.33 % et 82.60 ± 0.51 %, respectivement). Inversement, dans le test de chélation du fer ferreux, l'EBr a montré une excellente activité chélatrice ($IC_{50} = 0.332 \pm 0.001$ mg/mL). La colite expérimentale chez les souris a été induite par l'acide acétique. Les résultats ont révélé que le traitement des souris par l'extrait méthanolique de *Paronychia argentea* (EMPA) a montré une diminution très significative de l'indice d'activité de la maladie, du poids du côlon, du score d'activité macroscopique, de la protéine C-réactive (CRP), de la vitesse de sédimentation des érythrocytes (VS) et des concentrations coliques en malondialdéhyde (MDA). Ce traitement a également conduit à une augmentation très importante de la longueur du côlon, de la numération formule sanguine (FNS), des taux coliques en glutathion réduit (GSH) et de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT). Les coupes histologiques du côlon ont révélé une atténuation des dommages intestinaux et de l'infiltration des lymphocytes dans les souris traitées par l'EMPA, ce qui indique que cette plante a inhibé l'inflammation du côlon induite par l'acide acétique. En conclusion, *Paronychia argentea* peut servir comme un traitement naturel antioxydant et anti-inflammatoire pour la colite ulcéreuse.

ABSTRACT

Paronychia argentea, known as: Bssat El-moulouk or Kessaret Lahdjar, is used in the Algerian traditional medicine for the treatment of gastric ulcers and abdominal diseases. The present study is designed to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory properties of this plant extracts. The different extracts were prepared using solvents of increasing polarity. The determination of total polyphenols and flavonoids contents have shown that the ethyl acetate extract (EaE) is the most rich fraction, with a polyphenols content of 525.79 ± 0.79 mg EAG/g E, double than those of the crude extract (CE) and the chloroform extract (ChE), and a flavonoids content of 194.19 ± 8.62 mg EQ/g E, 5 and 15 times higher than those found in ChE and CE, respectively. Results of the antioxidant activity assessed by several *in-vitro* tests, revealed that all the extracts were effective in both xanthine oxidase inhibition and scavenging of superoxide anion radical produced by this enzyme in the following order: $ChE > EaE > CE$. Using DPPH, AAPH-induced hemolysis and FRAP tests, the EaE seems to have the highest anti-radical effect ($IC_{50} = 5.3 \pm 0.03$ μ g/mL), the highest anti-hemolytic activity ($HT_{50} = 131.66 \pm 2.99$ min) and the most potent reducing power (EC_1 at 4 min = 0.009 ± 0.001 g/L, EC_1 at 30 min = 0.005 ± 0.002 g/L). In the β -carotene bleaching assay, EaE and ChE exhibited an excellent inhibitory effect on linoleic acid oxidation (84.36 ± 0.33 % and 82.60 ± 0.51 %, respectively). Inversely, in the ferrous iron chelating assay, the CE showed the excellent chelating activity ($IC_{50} = 0.332 \pm 0.001$ mg/mL). Experimental colitis in mice was induced by acetic acid. Treatment of mice with *Paronychia argentea* methanolic extract (PAME) showed a very significant decrease in the disease activity index, colon weight, macroscopic activity score, C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR) and the colonic Malondialdehyde (MDA) concentrations. This treatment caused also a very important increase of colon length, full blood count (FBC), colonic reduced glutathione (GSH) concentrations and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities. Histological sections of the colon revealed an attenuation of the intestinal damage and the infiltration of lymphocytes in mice treated with PAME, indicating that this plant inhibited the colonic inflammation induced by acetic acid. In conclusion, *Paronychia argentea* may serve as a natural antioxidant and anti-inflammatory treatment for ulcerative colitis.