



DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2014

MÉMOIRE

Présenté par

**KHERBACHE Abdallah**

Pour l'obtention du diplôme de

**MAGISTER EN BIOLOGIE**

**Spécialité: BIOCHIMIE**

THÈME

**Propriétés anti-inflammatoire et antioxydante des extraits  
d'*Anacyclus clavatus***

Soutenue publiquement le ...../...../2014

DEVANT LE JURY

Président	<b>Senator Abderrahmane</b>	<b>Pr UFA Sétif 1</b>
Directeur	<b>Bouriche Hamama</b>	<b>Pr UFA Sétif 1</b>
Examineurs	<b>Arrar Lekhmici</b>	<b>Pr UFA Sétif 1</b>
	<b>Dahamna Saliha</b>	<b>Pr UFA Sétif 1</b>

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

## Dédicace



" قالوا سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا إنك أنت العليم الحكيم "

*Je dédie ce travail :*

*A mes parents, vous avez toujours été présents et m'avez toujours soutenu. Merci de tout cœur car sans votre aide et votre patience, je n'en serais pas là aujourd'hui.*

*A mes sœurs : pour leur soutien moral et pour leur amour et soins.*

*A tous mes amis et collègues*

*A tous ceux qui aiment la science*

*"C'est ce que nous pensons déjà connaître qui nous  
empêche souvent d'apprendre"*

*Claude Bernard*

## **Remerciements**

*Avant toutes choses, je remercie **ALLAH**, le tout puissant, pour m'avoir donné la force et la patience.*

*Je tiens à exprimer toutes mes reconnaissances à **Mme BOURICHE Hamama**, professeur à l'université de Sétif et directeur de cette thèse, pour l'accueil qu'elle m'a accordé dans son laboratoire, pour sa générosité, sa gentillesse, son encouragement, son soutien et de m'avoir fait confiance tout au long de la préparation de ce travail, qu'elle trouve ici toute ma gratitude et ma sympathie.*

*Mes remerciements s'adressent également à **Mr SENATOR Abderrahmane**, professeur à l'université de Sétif, pour son aide, ses conseils et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de soutenance.*

*Je tiens également mes vifs remerciements à **Mr ARRAR Lekhmici**, professeur à l'université de Sétif, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.*

*J'exprime mes vifs remerciements à **Mme DAHAMNA saliha**, professeur à l'université de Sétif, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de jury.*

*Je remercie tout particulièrement **KADA Seoussen** et **LAOUICHA saliha** qui m'ont aidé au quotidien dans la réalisation de ce travail du premier au dernier jour et qui créé au sein du laboratoire une ambiance agréable.*

*Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Que me pardonnent celles que j'oublie ici, mais j'adresse une pensée particulière à : **Nassima, Dalila, Sofiane, Nacer, Naouel, Ommaïma, Zina ....***

*Enfin, je voudrais remercier les personnes les plus importants à mes yeux, sans eux rien de tout cela n'aurait été possible, à savoir : mes **chers parents**, mes **sœurs** et ma **famille**. Merci pour leur amour, leur confiance, leur encouragement et leur inquiétude sur le bon déroulement de mes études.*

## Abstract

The aim of this study is to evaluate the anti-inflammatory and the antioxidant activities of aqueous (Aq.E) and methanolic (Met.E) extracts of the aerial part of *Anacyclus clavatus*. Firstly, polyphenols, flavonoids and tannins content were determined. Results showed that methanolic extract is rich in polyphenols, and tannins, while the aqueous extract is the richest in flavonoids. The topical application of 2 mg/ear of Met.E or Aq.E exerted 84 % and 83 % of inhibition, respectively in the croton oil induced ear edema in mice. These results are better than that obtained with indomethacin, used as standard anti-inflammatory agent. Similarly, pretreatment of rats orally by 200 and 400 mg/kg of Met.E or Aq.E prevented significantly the paw edema induced by carrageenan. Moreover, the effect of extracts on carrageenan-induced pleurisy in rat showed that oral administration of 400 mg/kg of Met.E or Aq.E exerted a significant reduction in the development of pleurisy and neutrophil migration. On the other hand, the antioxidant activity of Met.E and E.Aq was evaluated using the DPPH radical, chelation, linoleic acid peroxidation and reducing power tests. Results showed that both extracts exhibited a strong scavenging activity against DPPH radicals with IC<sub>50</sub> values of 28,30 ± 3,45 µg/ml and 68,98 ± 1,64 µg/ml, respectively. In addition, the E.Aq and Met.E showed a good chelating activity with IC<sub>50</sub> values of 74,64 ± 11,68 µg/ml and 152,93 ± 1,67 µg/ml, respectively. Moreover, Aq.E and Met.E inhibited the linoleic acid peroxidation with 76 % and 75 % respectively. These values are similar to that of the standard antioxidant (BHT). Both extracts exerted a strong concentration-dependent reducing power. Taken together, we can conclude that aqueous and methanolic extracts of aerial parts of *Anacyclus clavatus* exhibit anti-inflammatory and antioxidant properties, which support their use in traditional medicine.

**Key words:** *Anacyclus clavatus*, Inflammation, Anti-inflammatory, Oxidative stress, Antioxidant.

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضادة للالتهاب و المضاد للأكسدة لكل من المستخلص المائي و الميثانولي للجزء الهوائي لنبته *Anacyclus clavatus* . في البداية تم تقدير محتوى المستخلصين من المركبات متعددة الفينول والفلافونويدات والدباغ. فبينت النتائج أن المستخلص الميثانولي يحتوي على أكبر نسبة من متعددات الفينول و الدباغ في حين أن المستخلص المائي يحتوي على كمية أكبر من الفلافونويدات. لدراسة الالتهاب الحاد استعملت 3 نماذج : وذمة الاذن المحفزة بزيت croton , وذمة القدم المحفزة بمادة carragénine و التهاب الجنب المحفز أيضا بمادة carragénine. أظهرت المعالجة الموضوعية للفئران ب 2 ملغ للاذن من المستخلص الميثانولي و المائي تثبيطا معنويا للوذمة قدر ب 84 % و 83 % على التوالي. هذه النتائج احسن من المتحصل عليها مع مضاد الالتهاب المرجعي (اندوميتاسين). في حين ان المعالجة المسبقة للجرذان عن طريق الفم بالجرعات 200 مغ/كغ أو 400 مغ/كغ من المستخلص الميثانولي او المائي أبدت تأثيرا معنويا ضد التهاب القدم ابتداء من الساعة الاولى. كما بينت النتائج ان المستخلص المائي 200 مغ/كغ أعطى مفعولا أكبر من بقية الجرعات و أكبر من الأسبرين الذي استعمل للمقارنة. كما ان معالجة الفئران عن طريق الفم ب 400 مغ/كغ من المستخلصين أدى إلى انخفاض كبير في تطوير التهاب الجنب و هجرة الخلايا البيضاء المتعادلة. من جهة أخرى تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة للمستخلصين باستعمال كل من اختبار جذر DPPH و استخلاص المعادن و اكسدة حمض اللينوليك و كذلك اختبار القدرة على الإرجاع. أظهر كل من المستخلص المائي و الميثانولي نشاطية إزاحية جد عالية لجذر DPPH أكبر من نشاطية مضاد الأكسدة المرجعي BHT المستخدم للمقارنة. كما أظهر المستخلصان قدرة ت استخلاص معتبرة اتجاه الأيونات و قدر التركيز الممارس ل 50% من الفعل التمخلي ب  $11,68 \pm 74,64$  ميكروغرام/مل و  $1,67 \pm 152,93$  ميكروغرام/مل، على التوالي. كما ثبت التركيز المستخدم من المستخلص المائي و الميثانولي أكسدة حمض اللينوليك بقيم 76 % و 75 % على التوالي. وهذه القيم قريبة من القيم المتحصل عليها مع مضاد الأكسدة المرجعي (BHT). إضافة إلى ذلك يملك المستخلصان قدرة ارجاع مهمة تعتمد على التركيز. من خلال النتائج المتحصل عليها يمكن استخلاص أن نبات *Anacyclus clavatus* يمتاز بخصائص مضادة للالتهاب و للأكسدة، ما يدعم استعمالها في الطب التقليدي.

**الكلمات المفتاح:** *Anacyclus clavatus*، الالتهاب، مضادات الالتهاب، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة.

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits aqueux (E.Aq) et méthanolique (E.Met) de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus*. La teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des deux extraits a été évaluée. Les résultats montrent la richesse de l'E.Met en polyphénols et en tannins par rapport à l'E.Aq qui est le plus riche en flavonoïdes. Le traitement par 2 mg/oreille de l'E.Met ou l'E.Aq a inhibé l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez les souris avec 84 % et 83 % respectivement. Ces valeurs sont supérieures à ceux obtenus par l'indométacine utilisée comme anti-inflammatoire de référence. De même, le prétraitement par voie orale des rats par l'E.Met ou l'E.Aq à 200 et 400 mg/kg prévient de façon significative l'œdème de la patte induit par la carragénine. Cette inhibition est plus importante avec 200 mg/Kg de l'extrait aqueux. L'effet des extraits sur la pleurésie induite par la carragénine montrent que l'administration orale de 400 mg/kg d'E.Met ou E.Aq provoque une diminution significative du développement de la pleurésie et la migration des neutrophiles. Ces effets sont inférieurs à ceux obtenus avec l'aspirine, utilisée comme anti-inflammatoire de référence. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests au radical DPPH, chélation, peroxydation de l'acide linoléique et le test du pouvoir réducteur. Les résultats montrent que l'E.Met et l'E.Aq possèdent une forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH avec des  $IC_{50}$  de  $28,30 \pm 3,45 \mu\text{g/ml}$  et  $68,98 \pm 1,64 \mu\text{g/ml}$  respectivement. De même, une bonne activité chélatrice a été obtenue par les 2 extraits avec des  $IC_{50}$  de  $74,64 \pm 11,68 \mu\text{g/ml}$  et  $152,93 \pm 1,67 \mu\text{g/ml}$  respectivement. Les 2 extraits ont inhibé la peroxydation de l'acide linoléique avec 76 % et 75 % respectivement. Ces valeurs sont similaires à celles de BHT utilisé comme antioxydant de référence. De plus, les 2 extraits possèdent un pouvoir réducteur important concentration-dépendant. En conclusion, les extraits de la partie aérienne de l'*Anacyclus clavatus* ont des propriétés antioxydante et anti-inflammatoire qui supportent leur usage en médecine traditionnelle.

**Mots clés :** *Anacyclus clavatus*, Inflammation, Anti-inflammatoire, Stress oxydatif, Antioxydant.

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**AINS** : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

**BHT** : Butylated hydroxytoluene

**CAT** : Catalase

**COX** : Cyclooxygénase

**GPx** : Glutathion peroxydase

**GR** : Glutathion réductase

**GSH** : Glutathion réduit

**GSSG** : Glutathion oxydé

**ICAM-1** : Intercellular adhesion molecule -1

**IL** : Interleukines

**INF $\gamma$**  : Interféron gamma

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

**NF- $\kappa$ B** : Nuclear factor-kappa B

**NOS** : Nitrique oxyde synthase

**PAF** : Platelet Activating Factor

**PMNs** : Polymorphonucléaires neutrophiles

**SOD** : Superoxyde dismutase

**TGF** : Facteur de croissance de transformation

**TNF- $\alpha$**  : Facteur de nécrose tumorale

**VCAM-1** : Vascular cell adhesion molecule-1

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Etapes de l'inflammation aigue.
- Figure 2.** Médiateurs cellulaires et biochimiques de l'inflammation.
- Figure 3.** Cascade de l'acide arachidonique et sites d'action des anti-inflammatoires.
- Figure 4.** Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.
- Figure 5.** Sources cellulaires et interconversions des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote
- Figure 6.** Principales enzymes antioxydantes.
- Figure 7.** Régénération de la vitamine E par l'acide ascorbique.
- Figure 8.** Sites probables de la chélation des ions métalliques ( $Me^{n+}$ ) par les flavonoïdes.
- Figure 9.** Photographie montrant l'aspect morphologique de la plante *Anacyclus clavatus*.
- Figure 10.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique, de la quercétine et de l'acide tannique.
- Figure 11.** Effet des extraits de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.
- Figure 12.** Effet des extraits de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus* sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.
- Figure 13.** Effet des extraits d'*Anacyclus clavatus* et l'aspirine sur l'exsudation et le recrutement des PMNs.
- Figure 14.** Pourcentages des inhibitions de l'exsudation et du recrutement des PMNs par les extraits d'*Anacyclus clavatus* et l'aspirine.
- Figure 15.** Activité antiradicalaire des extraits d'*Anacyclus clavatus* et de l'antioxydant de référence BHT vis-à-vis du radical DPPH.
- Figure 16.** Activité chélatrice des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus* et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux.
- Figure 17.** Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits aqueux et méthanolique de l'*Anacyclus clavatus* et du BHT.
- Figure 18.** Activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique des extraits aqueux et méthanolique de l'*Anacyclus clavatus* et du BHT.
- Figure 19.** Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique d'*Anacyclus clavatus* et du BHT.

## LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Principaux effets de la substance P au cours de la réaction inflammatoire.

**Tableau 2.** Effets du NO<sup>•</sup> au cours de la réaction inflammatoire.

**Tableau 3.** Quelques maladies liées à l'inflammation.

**Tableau 4.** Effets pharmacologiques et modes d'action de certaines drogues d'origine végétale.

**Tableau 5.** Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins des extraits aqueux et méthanolique d'*Anacyclus clavatus*.

**Tableau 6.** Valeurs des IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> et PAR des extraits d'*Anacyclus clavatus* et du BHT. (Effet piègeur du radical libre DPPH).

**Tableau 7.** Valeurs des EC<sub>50</sub> et l'activité chélatrice en termes d'équivalents d'EDTA des extraits d'*Anacyclus clavatus*.

**Tableau 8.** Les EC<sub>50</sub> des extraits d'*Anacyclus clavatus* et du BHT (Pouvoir réducteur).

# SOMMAIRE

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>I. INFLAMMATION.....</b>	<b>5</b>
I.1. Inflammation aiguë.....	5
I.1.1. Phase vasculaire .....	5
I.1.2. Phase cellulaire.....	7
I.1.3. Phase de résolution.....	7
I.2. Inflammation chronique.....	8
I.3. Cellules inflammatoires .....	8
I.4. Médiateurs inflammatoires .....	9
I.5. Anti-inflammatoires.....	14
I.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens .....	14
I.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens .....	15
I.5.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale .....	16
<b>II. STRESS OXYDANT .....</b>	<b>18</b>
II.1. Espèces réactives de l'oxygène .....	18
II.2. Sources des espèces réactives oxygénées.....	21
II.3. Conséquences biochimiques du stress oxydant.....	22
II.4. Effets pathologiques du stress oxydant .....	24
II.5. Systèmes antioxydants .....	24
II.5.1 Systèmes antioxydants enzymatiques .....	24
II.5.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques .....	26
<b>III. LA PLANTE <i>ANACYCLUS CLAVATUS</i> (DESF.) PERS. ....</b>	<b>30</b>
III.1. Aspect botanique et classification.....	30
III.2. Usage traditionnel .....	30
III.3. Etude phytochimique .....	31
III.4. Propriétés biologiques.....	31

## PARTIE EXPERIMENTALE

<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>34</b>
I. Matériel.....	34
I.1. Animaux .....	34
I.2. Matériel végétal.....	34
I.3. Produits et Réactifs.....	34
I.4. Solutions de travail.....	34

II. Méthodes .....	35
II.1. Préparation de l'extrait aqueux .....	35
II.2. Préparation de l'extrait méthanolique .....	35
II.3. Dosage des polyphénols totaux .....	36
II.4. Dosage des flavonoïdes .....	36
II.5. Dosage des tannins .....	38
II.6. Activité anti-inflammatoire des extraits d' <i>Anacyclus clavatus</i> .....	38
II.6.1. Induction de l'œdème de l'oreille par l'huile de croton chez la souris .....	38
II.6.2. Induction de l'œdème de la patte par la carragénine chez le rat .....	38
II.6.3. Induction de la pleurésie chez le rat .....	39
II.7. Activité antioxydante des extraits d' <i>Anacyclus clavatus</i> .....	40
II.7.1. Effet piègeur du radical libre DPPH' .....	40
II.7.2. Chélation du fer ferreux .....	41
II.7.3. Peroxydation de l'acide linoléique .....	41
II.7.4. Pouvoir réducteur .....	42
II.8. Analyses statistiques .....	42
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>44</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>44</b>
I. Préparation des extraits d' <i>Anacyclus clavatus</i> .....	44
II. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins .....	44
III. Activité anti-inflammatoire des extraits d' <i>Anacyclus clavatus</i> .....	44
III.1. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris .....	44
III.2. Effet des extraits sur l'œdème de la patte induit par la carragénine .....	45
III.3. Effet des extraits sur la pleurésie induite par la carragénine chez le rat .....	45
IV. Activité antioxydante des extraits d' <i>Anacyclus clavatus</i> .....	49
IV.1. Effet piègeur du radical DPPH .....	49
IV.2. Effet chélateur du fer ferreux .....	51
IV.3. Effet sur la peroxydation de l'acide linoléique .....	53
IV.4. Pouvoir réducteur .....	53
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>56</b>
I. Préparation et dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins .....	56
II. Activités anti-inflammatoires .....	58
III. Activités antioxydantes .....	60
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>66</b>

# INTRODUCTION

L'inflammation est un mécanisme de défense impliqué dans un très grand nombre de pathologies humaines. Le stress oxydant est également à l'origine de plusieurs maladies humaines. Actuellement, de nombreuses recherches ont été orientés vers les effets antioxydants et anti-inflammatoire des plantes qui pourraient être des atouts importants dans la prévention et le traitement de diverses maladies, avec des effets secondaires moindres.

La phytothérapie reste la médecine la plus employée dans le monde. En effet, près de 90 % de la population mondiale utilise encore des plantes brutes et des extraits non raffinés de plantes pour se soigner. En plus, presque 25 % des produits pharmaceutiques modernes contiennent des substances d'origine végétale. Ces dernières représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable. Toutes les civilisations antiques ont développé à côté de l'agriculture, la médecine par les plantes et la plupart des grands médecins du passé ont été des phytothérapeutes. Certaines plantes possèdent des activités antiseptiques, bactéricides, antifongiques, antivirales, antimitotiques, antirhumatismales, circulatoires, antidiabétiques, immunostimulantes, hyper ou hypotensives, tonifiantes, antispasmodiques...etc. Les plantes identifiées et classifiées par les botanistes sont devenues une matière première pour l'industrie pharmaceutique et la médecine folklorique. Par opposition aux drogues obtenues par synthèse chimique ou par extraction des principes actifs, la phytothérapie est la médecine naturelle par excellence. Mais les règles de leur utilisation manquent parfois de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences de la thérapeutique moderne. Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées dans le but de vérifier la sûreté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour leur usage. C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail. L'objectif essentiel de ce travail est d'explorer l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus*, une plante utilisée en médecine traditionnelle algérienne pour ses effets anti-inflammatoire, antibactérien et antifongique.

Les objectifs de ce travail sont :

- Préparation des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus*.
- Evaluation de la teneur en polyphénols, en flavonoïdes et en tannins des 2 extraits étudiés.
- Etude de l'effet anti-inflammatoire des 2 extraits selon 3 modèles expérimentaux *in vivo* :
  - Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.
  - Œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat.
  - Pleurésie induite par la carragénine chez le rat.
- Evaluation de l'activité antioxydante des 2 extraits étudiés par les tests de DPPH, chélation du fer ferreux, peroxydation de l'acide linoléique et le test du pouvoir réducteur.

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

# I. INFLAMMATION

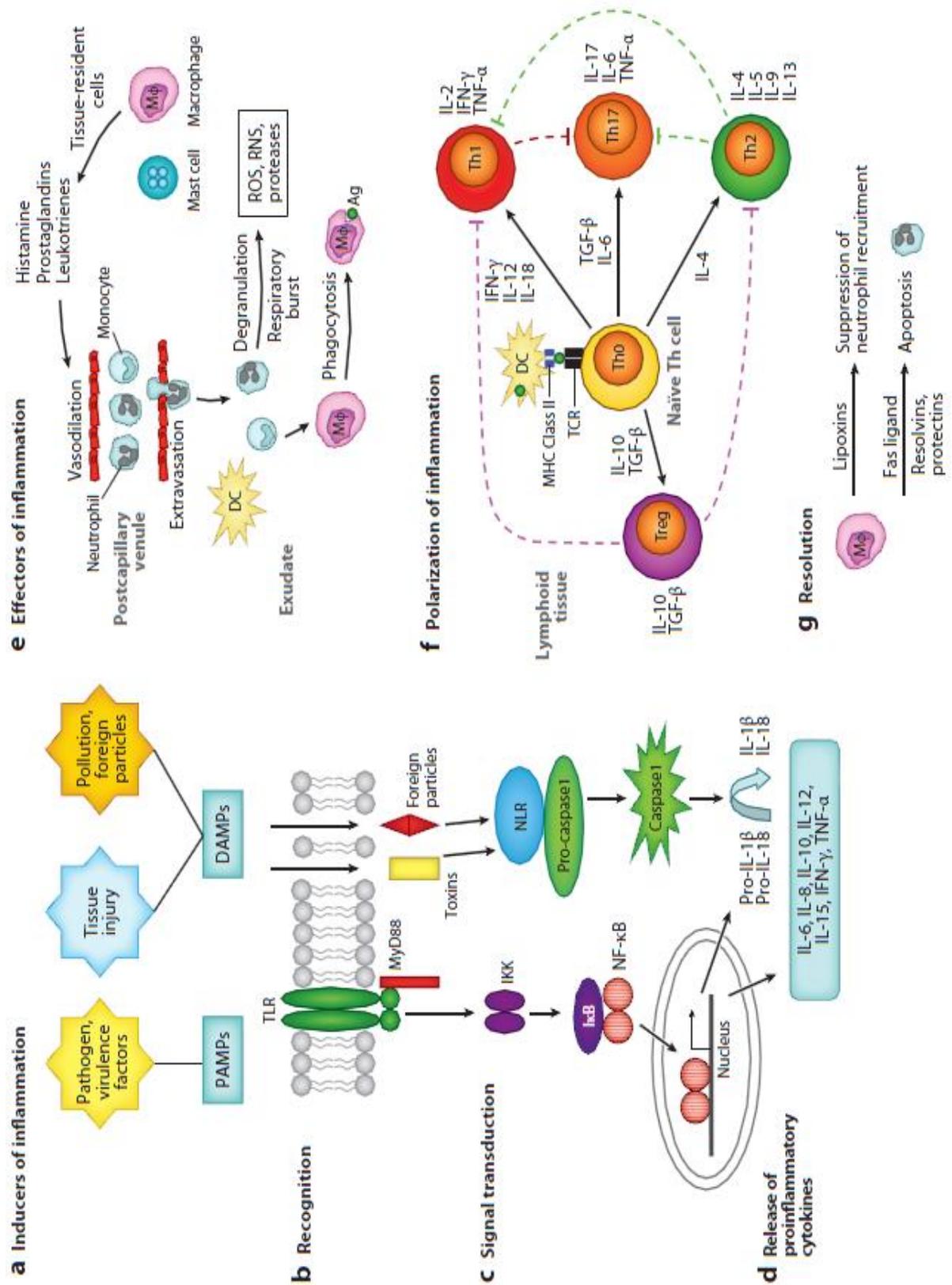
La réaction inflammatoire est une réaction de défense non spécifique de l'organisme à une agression bactérienne ou virale, un traumatisme, une brûlure, une irradiation ou une réaction immunitaire (Henrotin *et al.*, 2001). La fonction principale de l'inflammation est d'éliminer l'agent agresseur et de permettre la réparation des tissus. L'inflammation de courte durée (aiguë) est un phénomène bénéfique pour l'organisme qui vise à restaurer son intégrité physiologique. Alors que l'aspect négatif de l'inflammation intervient quand cette dernière se pérennise et devient chronique (Weill *et al.*, 2003).

## I.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est caractérisée par quatre signes cliniques cardinaux qui sont la tuméfaction, l'hyperhémie, l'hyperthermie et la douleur. Elle dure de quelques jours à quelques semaines. L'inflammation aiguë se déroule en plusieurs phases (**Figure 1**), une phase vasculaire immédiate caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des microorganismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui conduit à la restauration des tissus (Weill *et al.*, 2003).

### I.1.1. Phase vasculaire

L'activation des plaquettes constitue la première étape de la phase vasculaire (Steinhubl, 2007). Les mastocytes résidents sont également susceptibles d'initier la réaction inflammatoire (Botting et Botting, 2000). Une fois ces deux types de cellules sont activés, plusieurs médiateurs tels que la sérotonine, l'histamine et des dérivés de l'acide arachidonique sont libérés. L'activation de la cascade de la coagulation et du système du complément conduit à la génération de divers médiateurs doués d'activités vasodilatatrices et chimioattractantes comme le facteur XII, la fibrine, la bradykinine...etc. (Fauve et Hevin, 1998). Ceci induit une vasodilatation des vaisseaux sanguins avec une augmentation du débit local et une modification de la perméabilité vasculaire, ce qui permet l'extravasation des protéines plasmatiques vers les tissus (exsudation). Selon Börzsei *et al.* (2008) les neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine sont également susceptibles de déclencher les événements de la phase vasculaire de l'inflammation (inflammation neurogénique). Suite à une stimulation, ces neurones libèrent des médiateurs qui induisent une vasodilatation et une exsudation plasmatique en agissant sur les cellules endothéliales et les muscles lisses des vaisseaux sanguins (Birklein et Schmelz, 2008). Il est également admis que les neurones sensoriels contiennent des cyclooxygénases capables de synthétiser les prostaglandines (Richardson et Vasko, 2002).



**Figure 1.** Etapes de l'inflammation aigue (Ashley *et al.*, 2012).

L'augmentation du débit microcirculatoire au niveau du site enflammé explique en partie, l'apparition de la chaleur et de la rougeur, tandis que l'exsudation plasmatique induit l'œdème par distension des tissus et provoque une hyperpression sur les terminaisons nerveuses locales, ce qui explique les sensations de tuméfaction et de douleur (Weill *et al.*, 2003).

### **I.1.2. Phase cellulaire**

L'exsudation plasmatique permet l'apparition de plusieurs substances dans les espaces extravasculaires (anticorps, bactéricides, facteurs de coagulation, composants du complément, interleukines, interférons...etc.) en plus des leucocytes. La première étape de l'afflux des leucocytes consiste en une marginalisation des leucocytes grâce à l'expression d'adhésines au niveau des cellules endothéliales et des leucocytes activés (Fauve et Hevin, 1998). Ceci permet l'interaction entre l'endothélium et les phagocytes du sang, principalement les polynucléaires neutrophiles (PMNs) et les monocytes, et leur passage à travers les cellules endothéliales. Guidées par le gradient de concentration des chimioattractants, les leucocytes parviennent au tissu lésé (Weill *et al.*, 2003).

Les macrophages déclenche avec les PMNs la phagocytose des agents extérieurs et/ou des débris cellulaires. De nombreuses protéases (collagénase, élastase, gélatinase) et radicaux libres de l'oxygène et de l'azote dont les effets sont très importants sont produits au cours de la phagocytose (Fauve et Hevin, 1998).

### **I.1.3. Phase de résolution**

L'arrêt de la réponse inflammatoire fait intervenir plusieurs médiateurs tel que les cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- $\beta$ 1), l'expression des récepteurs solubles comme TNF- $\alpha$  et l'apoptose des cellules inflammatoires (Eming *et al.*, 2007). La réparation des tissus fait intervenir les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Eming *et al.*, 2007). Dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles. Les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Le retour à un état physiologique consiste dans un premier temps à la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes (Weill *et al.*, 2003). Si l'atteinte entraîne une destruction tissulaire, ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui produisent les protéines de la matrice intercellulaires comme le collagène, la fibronectine et la laminine, pour permettre la reconstruction des tissus. Le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (Weill *et al.*, 2003).

## **I.2. Inflammation chronique**

L'inflammation chronique est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années et qui peut se prolonger tout au long de la vie de l'individu (Fauve et Hevin, 1998). A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentatives de réparation sont également présents (Weill *et al.*, 2003). Les macrophages constituent l'essentiel de l'infiltrat cellulaire vers le site inflammatoire (Fauve et Hevin, 1998; Weill *et al.*, 2003). Tandis que la présence des polynucléaires éosinophiles est caractéristique des inflammations chroniques allergiques et parasitaires (Dombrowicz et Capron, 2007).

## **I.3. Cellules inflammatoires**

### **I.3.1. Polynucléaires neutrophiles**

Les polynucléaires neutrophiles (PMNs) représentent le composant cellulaire majeur de l'inflammation aiguë (40–75% des cellules inflammatoires). Elles migrent sous l'effet des chimioattractants vers le site inflammatoire où ils phagocytent l'agent agresseur ou les débris cellulaires. Les PMNs libèrent différentes molécules telles que les protéinases, les chimokines et des cytokines pro-inflammatoires (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1996). Les PMNs sont également impliquées dans la réparation tissulaire (Eming *et al.*, 2007).

### **I.3.2. Mastocytes**

Les mastocytes sont des cellules résidentes des tissus conjonctifs qui jouent un rôle très important dans le déclenchement de la réaction inflammatoire. Elles contiennent dans leur cytoplasme de très nombreuses granulations contenant des médiateurs inflammatoires comme la sérotonine, l'histamine, l'héparine et des cytokines (Williams et Galli, 2000). Elles sont impliquées dans la réparation tissulaire (Eming *et al.*, 2007).

### **I.3.3. Monocytes**

Les monocytes migrent vers le site inflammatoire et se différencient en macrophages, pour assurer la phagocytose. Elles interviennent aussi dans l'amplification de la réaction inflammatoire en libérant des médiateurs stimulant d'autres cellules inflammatoires. Elles interviennent également dans la phase de réparation tissulaire (Eming *et al.*, 2007).

### **I.3.4. Plaquettes**

Les plaquettes sanguines participent à l'hémostase et la cicatrisation des lésions tissulaires. Les plaquettes fournissent des chimokines et des activateurs des cellules sanguines circulantes et des cellules de la paroi vasculaire. Elles produisent des écosanoides et libèrent des peptides et d'autres médiateurs agissant sur la perméabilité vasculaires, elles activent le complément, libèrent des protéases, fournissent des facteurs de croissance des fibroblastes, des cellules de l'endothélium vasculaire et des cellules musculaire lisses (Steinhubl, 2007). De plus, elles stimulent les phénomènes inflammatoires par l'intermédiaire des leucocytes et des cellules endothéliales, comme elles interagissent avec les micro-organismes (Medzhitov, 2008).

### **I.3.5. Polynucléaires basophiles**

Les basophiles sont les plus rares des polynucléaires (moins de 1 % des cellules inflammatoires). Elles présentent également un cytoplasme qui contient de nombreuses granules riches en médiateurs pro-inflammatoires. Les basophiles sont des cellules phagocytaires qui interviennent principalement dans les réactions allergiques (Rankin, 2004).

### **I.3.6. Polynucléaires éosinophiles**

Les éosinophiles représentent 1 à 6 % des cellules inflammatoires. Leur fonction principale est de s'attaquer aux parasites via le contenu de leurs granules. Elles interviennent aussi dans la modulation et la propagation de la réponse immunitaire adaptative en activant directement les lymphocytes T (Hogan *et al.*, 2008).

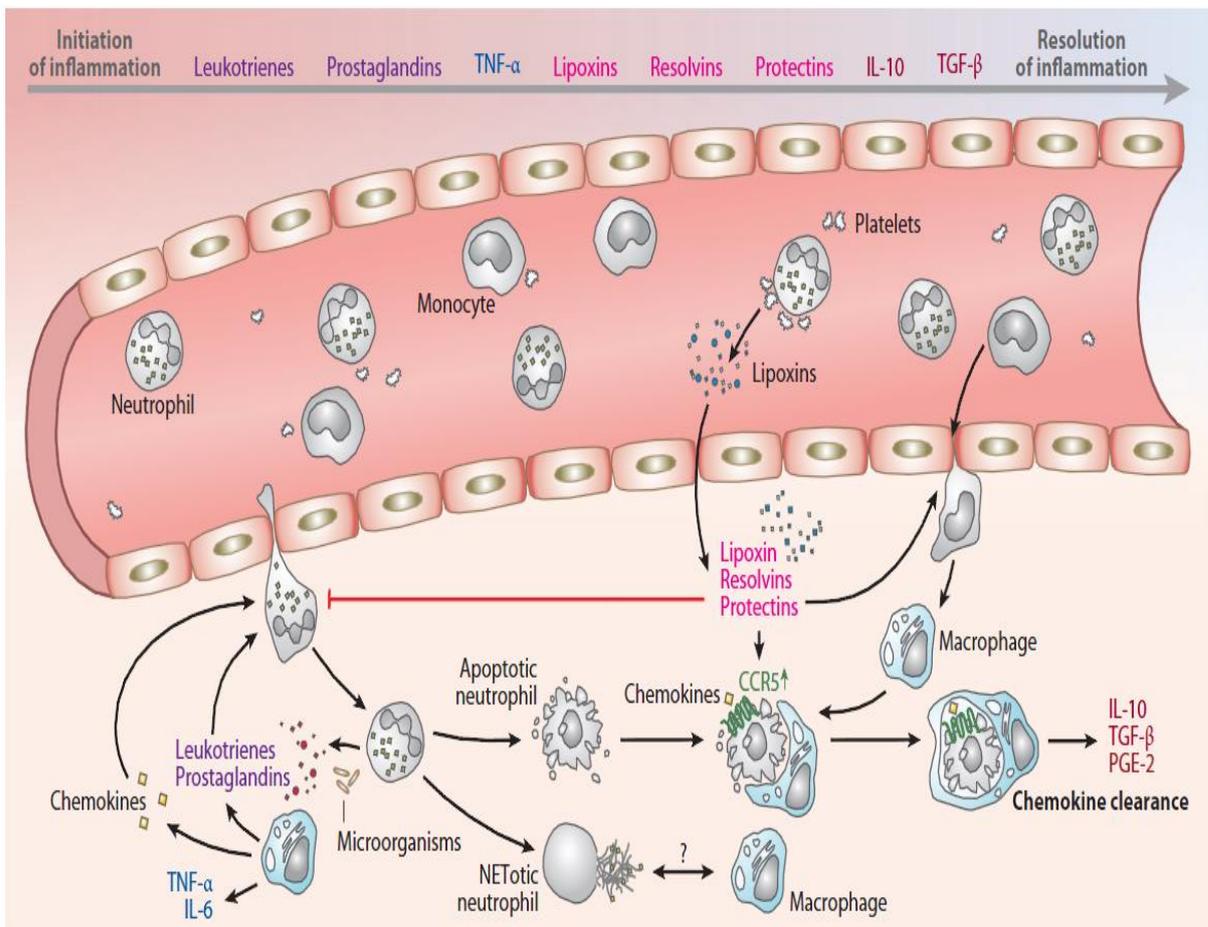
## **I.4. Médiateurs inflammatoires**

La réaction inflammatoire est caractérisée par une succession d'évènements permettant l'acheminement des leucocytes jusqu'au foyer inflammatoire. Ces étapes sont contrôlées par de nombreux médiateurs humoraux et cellulaires parmi lesquels on compte des cytokines, des prostanoïdes, des leucotriènes, des formes activées de l'oxygène et de l'azote, des neuropeptides, des fractions de complément, des facteurs de coagulation ou encore des métalloprotéases (**Figure 2**).

### **I.4.1. Cytokines**

La balance entre les cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) et anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, IL-13, TGF $\beta$ ) gère localement l'intensité et la durée de la réaction inflammatoire. L'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  jouent un rôle primordial dans l'initiation et la

chronicité de la réaction inflammatoire (Black *et al.*, 1997), elles sont également impliquées dans la régénération du tissu enflammé (Dinarello, 1997).



**Figure 2.** Médiateurs cellulaires et biochimiques de l'inflammation (Amulic *et al.*, 2012).

Les chimokines sont des cytokines chimioattractantes pour les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes et les lymphocytes T et B (Keane et Strieter., 2000). Elles sont produites par les leucocytes, les plaquettes et la plupart des cellules des tissus conjonctifs en réponse à des produits bactériens et viraux, à IL-1, au TNF- $\alpha$ , au C5a et au leucotriène LTB<sub>4</sub>. Elles attirent les leucocytes au niveau du foyer inflammatoire, en favorisant leur adhésion à l'endothélium, leur diapédèse et leur chimiotactisme (Baggioni, 1988).

#### I.4.2. Neuropeptides

De nombreux neuropeptides sont impliqués dans la régulation de la réaction inflammatoire. La stimulation des fibres afférentes du nociception A $\delta$  et C, induit la libération des neuropeptides stockés dans l'extrémité axonale de ces fibres. Le principale neuropeptide

impliqué dans ce réflexe axonale est la substance P. De nombreuses cellules possèdent des récepteurs membranaires pour cette substance dont les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les lymphocytes, les macrophages, les mastocytes ou encore les fibroblastes et les chondrocytes (Lam et Ferrel, 1991; Schaffer *et al.*, 1998). Les principaux effets de la substance P au cours de l'inflammation sont résumés dans le **tableau 1**.

### **I.4.3. Médiateurs lipidiques**

Les prostanoides, les leucotriènes et le PAF (Platelet Activating Factor) résultent du métabolisme de l'acide arachidonique. Les prostaglandines et la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) sont des vasodilatateurs puissants tandis que le thromboxane (TXA<sub>2</sub>) exerce un effet vasoconstricteur. Le TXA<sub>2</sub> est un indicateur de l'agrégation plaquettaire, alors que le PGI<sub>2</sub> exhibe des propriétés anti-agrégantes. De plus, les prostaglandines et la prostacycline contribuent à la formation de l'œdème et à la genèse des influx nociceptifs (Simon, 1999). Enfin le PGE<sub>2</sub> inhibe la synthèse de cytokines (IL-2, IL-12, INF $\gamma$ ...etc.) activatrices des lymphocytes, ce qui lui confère des propriétés immunosuppressives (Van der Pouw *et al.*, 1995).

Les leucotriènes sont des médiateurs importants de l'allergie et des réactions inflammatoires. Ils augmentent la perméabilité vasculaire et participent avec d'autres médiateurs à la formation de l'œdème. Ils possèdent également des propriétés chimiotactiques pour les éosinophiles et les neutrophiles (Santais *et al.*, 1998).

Le PAF résulte de l'action successive de deux enzymes, la phospholipase A<sub>2</sub> et l'acétyltransferase. La production du PAF est, en général, simultanée à l'activation des voies des cyclo-oxygénases et des lipo-oxygénases. Les leucotriènes stimulent la production du PAF alors que le PGI<sub>2</sub> l'inhibe. Le PAF stimule l'agrégation plaquettaire, augmente la perméabilité vasculaire et active les leucocytes (Peplow et Mikhalidis, 1990).

### **I.4.4. Fractions du complément**

Les principales activités biologiques du système du complément sont, l'opsonisation pour faciliter la phagocytose et la lyse des micro-organismes pathogènes. Les fragments C3a et C5a interviennent à plusieurs niveaux dans le développement de la réaction inflammatoire (Jagels *et al.*, 2000) :

- Augmentent la perméabilité vasculaire
- Stimulent le chimiotactisme des neutrophiles.

- Activent les neutrophiles et la formation de ROS.
- Stimulent la production de leucotriènes par les neutrophiles.
- Provoquent la dégranulation des mastocytes et la libération d’histamine.
- Provoquent la contraction des muscles lisses.

**Tableau 1.** Principaux effets de la substance P au cours de la réaction inflammatoire (Henrotin *et al.*, 2001).

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminue le tonus vasculaire</li> <li>• Augmente la perméabilité vasculaire</li> <li>• Stimule la production de monoxyde d’azote par les cellules endothéliales</li> <li>• Induit l’expression de sélectine P par les cellules endothéliales</li> <li>• Stimule le chimiotactisme des neutrophiles</li> <li>• Stimule la production de prostaglandines par les macrophages</li> <li>• Stimule la production de ROS par les macrophages</li> <li>• Induit l’expression d’ICAM-1 par les lymphocytes T</li> <li>• Stimule la prolifération des lymphocytes T</li> <li>• Augmente la synthèse d’immunoglobulines par les cellules B</li> <li>• Induit la dégranulation des mastocytes et la libération d’histamine</li> <li>• Stimule la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL-1<math>\beta</math>, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>)</li> </ul>
---

#### **I.4.5. Facteurs de la coagulation**

Les facteurs de la coagulation sont un système multiprotéique dont les composants sont présents dans le sang où ils demeurent à l’état de précurseurs inactifs, jusqu’à ce qu’ils soient actifs en présence d’un activateur spécifique. Ils contribuent au développement de la réaction inflammatoire. L’IL-1 et le TNF- $\alpha$  stimulent l’expression du facteur tissulaire par les cellules endothéliales, ce qui constitue une étape majeure de l’activation initiale des facteurs de la coagulation (Holmdahl et Ivarsson, 1999). Au cours de l’inflammation, le système de la coagulation est principalement activé par sa voie extrinsèque, c’est-à-dire par l’action de la thromboplastine tissulaire exprimée à la faveur d’une lésion tissulaire à la surface des monocytes et des cellules endothéliales. La fibrine intervient dans la réaction inflammatoire en stimulant l’activité des polynucléaires neutrophiles, des plaquettes et des cellules endothéliales (Colman, 1999).

#### I.4.6. Formes activées de l'oxygène et de l'azote

La production de formes activées de l'oxygène est stimulée par des endotoxines, leucotriènes, cytokines (INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-12) et le C5a (Henrotin *et al.*, 2001). Le monoxyde d'azote (NO $\cdot$ ) identifié comme un médiateur inflammatoire et notamment un puissant vasodilatateur (**tableau 2**) est induit par l'IL-1 $\beta$ , le TNF $\alpha$ , l'INF $\gamma$ , le PAF et les lipopolysaccharides, mais réprimé par le TGF- $\beta$ , l'IL-4 et l'IL-10 (Glancy *et al.*, 1998).

Les effets des ROS peuvent être pro- ou anti-inflammatoire selon l'importance et le lieu de leur production, le type de la réponse étudié et leur capacité à réagir avec d'autres formes activées de l'oxygène. Les ROS sont également impliquées dans l'apoptose et la protéolyse focalisée de la matrice extracellulaire (Stichtenoth et Frolich, 1998). De plus, ils jouent le rôle de second messager dans l'activation de NF- $\kappa$ B par l'IL-1 $\beta$  (Bonizzi *et al.*, 2000).

#### I.4.7. Métalloprotéases

La protéolyse matricielle est un mécanisme impliqué dans la résorption des tissus endommagés du foyer inflammatoire. Pour être efficace et sans conséquences pathologiques, elle doit être strictement contrôlée. Dans le cas contraire, la réaction inflammatoire s'accompagne de lésions tissulaires souvent irréversibles, responsables d'atteintes fonctionnelles graves de l'organe lésé. Les agents responsables de la dégradation des tissus sont les ROS et les métalloprotéases (Gaudin *et al.*, 1998).

**Tableau 2.** Effets du NO $\cdot$  au cours de la réaction inflammatoire (Henrotin *et al.*, 2001).

Actions pro-inflammatoires	Actions anti-inflammatoires
<ul style="list-style-type: none"><li>• Vasodilatateur</li><li>• Cytotoxique</li><li>• Stimule la production de prostaglandine E<sub>2</sub></li><li>• Stimule la production de TNF<math>\alpha</math> par les synoviocytes</li><li>• Active les métalloprotéases.</li><li>• Augmente la production de TNF<math>\alpha</math> et IL-1<math>\beta</math></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Inhibe l'adhésion des leucocytes à l'endothélium</li><li>• Inhibe l'expression de la sélectine-P par les plaquettes et l'endothélium</li><li>• Inhibe la prolifération des lymphocytes</li><li>• Inhibe la dégranulation des mastocytes</li><li>• Inhibe l'activité de la NADPH oxydase</li><li>• Inhibe la production de prostaglandine E<sub>2</sub></li><li>• Inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8)</li></ul>

## I.5. Anti-inflammatoires

L'inflammation est impliquée dans plusieurs pathologies humaines comme l'illustre le **tableau 3**. Une thérapeutique anti-inflammatoire destinée à contrôler l'excès des réactions aspécifiques des tissus et à éviter la transformation de la phase aiguë de l'inflammation en phase chronique s'impose. Du fait de la grande variété des stimuli phlogogènes, les anti-inflammatoires sont très divers et appartiennent à des classes chimiques très différentes.

**Tableau 3.** Quelques maladies liées à l'inflammation (Nathan, 2002).

<b>Maladies dans lesquelles l'inflammation joue le rôle pathogénique principal</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Asthme</li><li>• Polyarthrite rhumatoïde</li><li>• Artériosclérose</li><li>• Arthrose</li><li>• Goutte</li><li>• Thyroïdite d'Hashimoto</li><li>• Maladie d'Alzheimer</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Lupus érythémateux disséminé</li><li>• Eczéma</li><li>• Maladie de Crohn</li><li>• Spondylarthrite ankylosante</li><li>• Rectocolite hémorragique</li><li>• Broncho-pneumopathie chronique obstructive</li></ul>
<b>Maladies infectieuses dans lesquelles l'inflammation est impliquée</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Hépatite C</li><li>• Dysenterie bactérienne</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tuberculose</li><li>• Gastrite induite par <i>Helicobacter pilory</i></li></ul>
<b>Maladies dans lesquelles la fibrose poste inflammatoire est la cause principale</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Fibrose pulmonaire idiopathique</li><li>• Bilharziose</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cirrhose hépatique poste virale ou alcoolique</li></ul>

### I.5.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

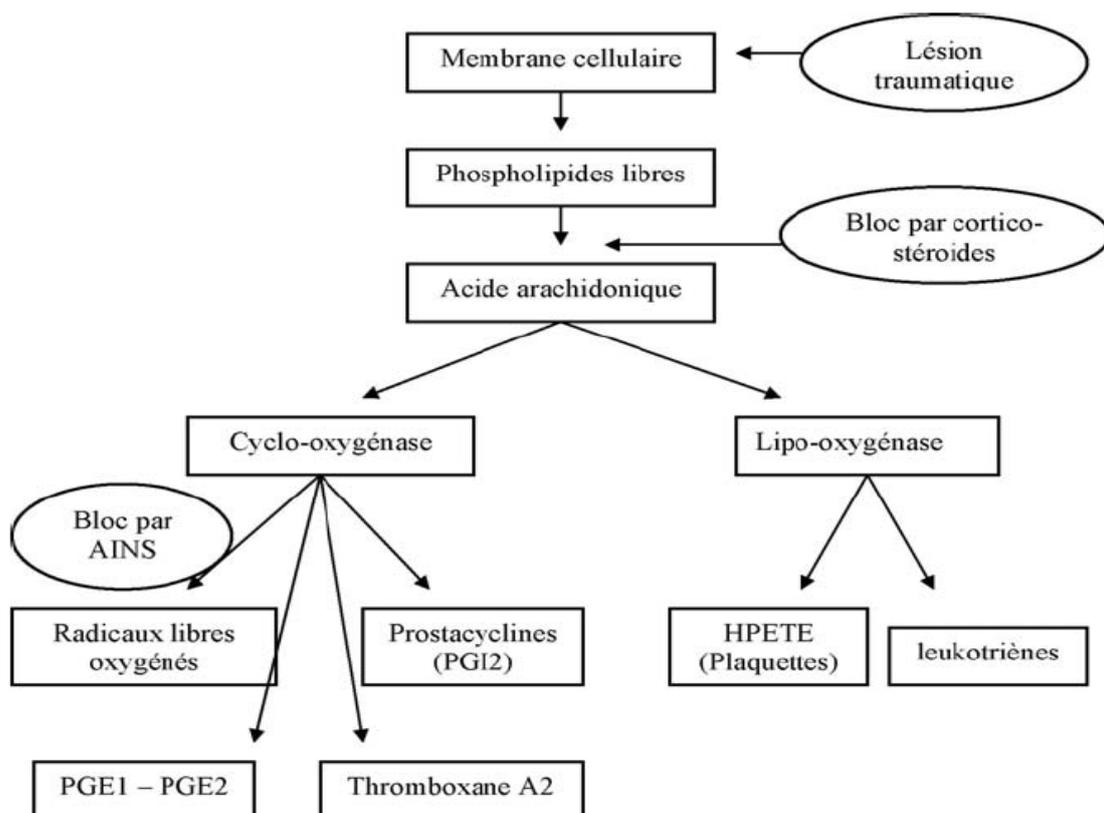
Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont utilisés avec succès pour le soulagement de la douleur et de la fièvre. Ce sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique, mais ils ont en commun l'inhibition non sélective de la cyclooxygénase (Bidaut-Russel, 2008).

Cependant, l'usage des AINS est associé à de nombreux effets indésirables (Bidaut-Russell, 2008), attribués à leur inhibition non sélective des isoformes de la cyclooxygénase (**Figure 3**). La COX-1 qui se trouve de façon constitutive dans la plupart des tissus humains est un bon exemple. En effet cette enzyme intervient dans la protection de la muqueuse gastrique, l'agrégation plaquettaire, l'homéostasie vasculaire et le maintien de l'équilibre

hydrosodé (Blain *et al.*, 2000; Corrado *et al.*, 2009). Son inhibition par les AINS est responsable des effets indésirables. Pour cette raison, les laboratoires de l'industrie pharmaceutique ont essayé de développer des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 qui est une enzyme induite après l'exposition de l'organisme aux stimuli inflammatoires.

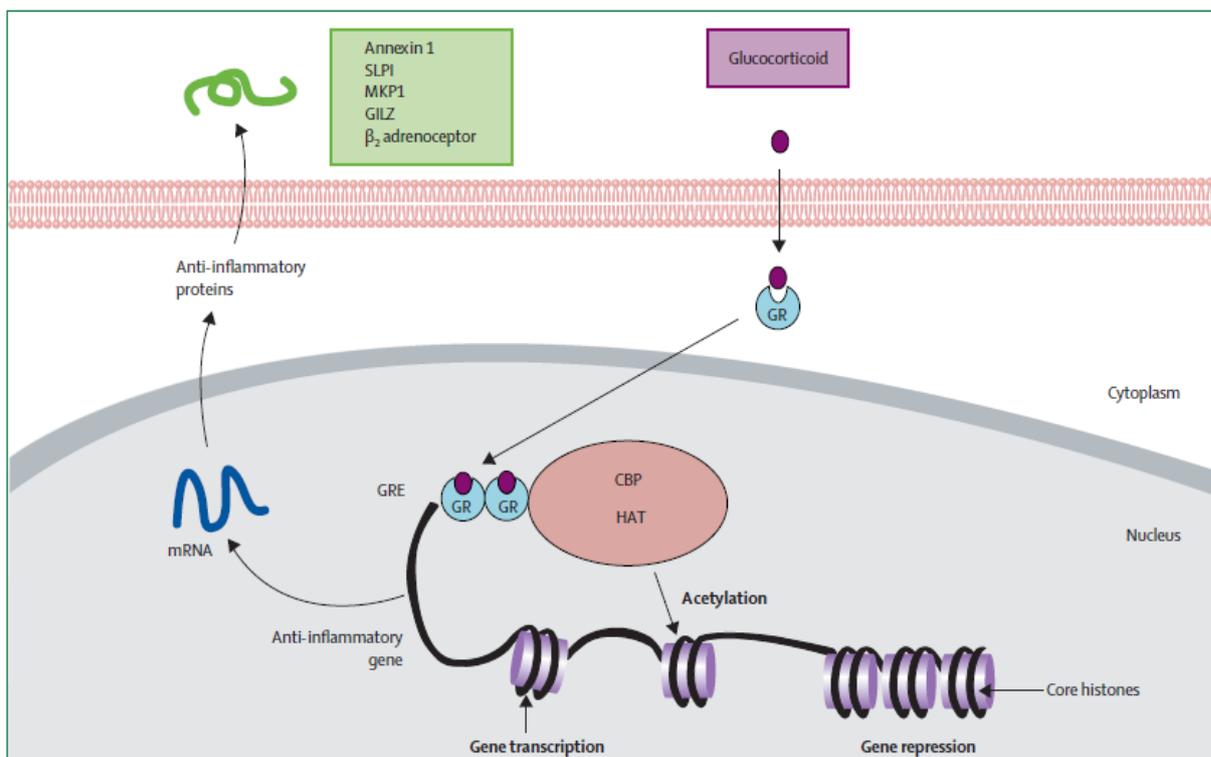
### I.5.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immune (Payne et Adcock, 2001). Leur mécanisme d'action (**Figure 4**) est le même que celui des glucocorticoïdes endogènes. Ils induisent une élévation de la transcription des gènes codants pour les protéines anti-inflammatoires telles que la lipocortine-1 et l'interleukine 10, avec une inhibition de l'expression de plusieurs gènes codants pour des protéines pro-inflammatoires incluant des cytokines, des enzymes, des récepteurs et des molécules d'adhésion (Barnes, 1998).



**Figure 3.** Cascade de l'acide arachidonique et sites d'action des anti-inflammatoires (Ziltener *et al.*, 2010).

Comme pour les AINS, l'usage des glucocorticoïdes est associé à de nombreux effets indésirables. Le risque d'apparition de ces effets s'accroît avec la durée du traitement et la posologie. Divers troubles peuvent être observés, troubles aigus tel que l'hypertension artérielle, la dérégulation de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes, l'euphorie avec insomnie allant jusqu'à une psychose aiguë et l'apparition d'ulcères gastro-duodénaux. Des troubles chroniques peuvent aussi se manifester tel que l'ostéoporose, la cataracte et la prise de poids (Henzen, 2003).



**Figure 4.** Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (Barnes et Adcock, 2009). GRE : Glucocorticoid Response Element; CBP : Cyclic AMP Response Element Binding Protein; HAT: Histone Acetyltransferase; GR: Glucocorticoid Receptor.

### I.5.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les plantes sont très utilisées en médecine traditionnelle pour soulager les malades atteints de certaines affections inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, l'arthrose, la goutte, la rhinite allergique, les ulcères gastriques et duodénaux (Setty et Sigal, 2005; Wiart, 2006).

L'activité anti-inflammatoire des plantes revient à leur contenu en métabolites secondaires bioactifs tels que les polyphénols, les stérols, les alcaloïdes, les saponines, les coumarines, les terpènes...etc. Ces substances actives peuvent agir à plusieurs étapes de la réaction inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique, les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse

des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion, l'activation du facteur nucléaire kappa-B et la production des espèces oxygénées réactives (Duwiejua et Zeitlin, 1993).

Les études menées *in vitro* et *in vivo* ont montré l'effet anti-inflammatoire d'un grand nombre de plantes ainsi que le mécanisme d'action (**tableau 4**).

**Tableau 4.** Effets pharmacologiques et modes d'action de certaines drogues d'origine végétale (Goetz, 2011).

Plantes	Principes actifs connus	Effets pharmacologiques	Modes d'actions
<i>Erythraea centaurium</i> ,	Acides phénoliques gentiopicroside	Anti-inflammatoire	- Inhibition du TNF $\alpha$ dans le tissu hépatique
<i>Curcuma longa</i> ,	Curcumine Huile essentielle	Anti-inflammatoire Anti apoptotique Antioxydant	- Inhibition de l'agrégation plaquettaire - Inhibition de la réponse neutrophile - Inhibition de multiples facteurs impliqués dans l'inflammation (phospholipase, lipooxygénase, COX-2, leucotriènes, thromboxane, prostaglandines, collagénase, élastase, hyaluronidase, MCP-1, de TNF et de l'IL-1,2
<i>Ananassa comosus</i>	Bromélaïnes	Anti-inflammatoire enzymatique	- Protéolytique, fibrinolytique et antiagrégant - Activateur du facteur XII de Hageman et de la prékallitréine sérique.
<i>Salix ssp</i>	Salicine, salicylés Salicortine, Trémulacine	Anti-inflammatoire	- Anti-inflammatoire, antipyrétique, uricosurique, antiagrégant et inhibiteur de la fixation plasmatique de l'albumine. - I inhibition des cytokines; TNF $\alpha$ , COX-2 et le NF-kB
<i>Filipendula ulmaria L.</i>	Monotropitine Spiraeïne, Aldéhyde Salicylique	Anti-inflammatoire	- Inhibe par voie gastrique, la synthèse des IL-2 des splénocytes, et par suppression de la production pro-inflammatoire des cytokines - Fibrinolytique
<i>Echinacea angustifolia</i> , <i>Echinacea purpurea</i> , <i>Echinacea pallida</i> ,	Alkamides Polysaccharides	Anti-inflammatoire et antalgique	- Inhibition de la COX-1, la COX-2 et la 5-lipoxgénase - Stimulation de la surrénale
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Aescine	Anti-inflammatoire Anti-cédémateux Tonique veineux	- Anti-cédémateux est lié à une perméabilité vasculaire sélective, induisant l'augmentation du tonus veineux et artériel - Réduit la fragilité des capillaires, diminution de l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium
<i>Zingiber officinale</i>	Gingérol, 8-shogaol	Anti-inflammatoire, anti-cédémateux, analgésique	- Inhibition de la COX-2 - Antiplaquettaire - Inhibition de la production de prostaglandines
<i>Passiflora incarnata</i> ,	Chrysine	Anti-inflammatoire, antalgique, sédatif	- Effet sur le système nerveux - Antiatéromatase
<i>Urtica dioica</i>	Acide caféoylmalique	Antalgique, anti-inflammatoire	- Inhibition du TNF $\alpha$ et d'IL-1b - Inhibition de la production de cellules T-Helper et d'IL-2.

## II. STRESS OXYDANT

L'équilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et leur neutralisation est lié à la présence de nombreux systèmes antioxydants. Le stress oxydant est reconnu comme une altération de l'homéostasie redox cellulaire (Favier, 2003). Il s'agit d'une perturbation de l'équilibre pro-oxydant/antioxydant en faveur des pro-oxydants, conduisant à des dommages cellulaires potentiels.

### II.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou de l'azote (RNS), sont produites en permanence par plusieurs types de cellules. Cette synthèse est assurée par différents systèmes enzymatiques dont les plus importants sont les NAD(P)H oxydases, les NO synthases et la chaîne respiratoire (**Figure 5**).

#### II.1.1. Radical superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ )

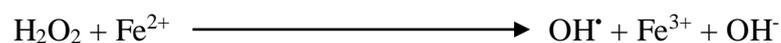
Bien que l'anion superoxyde soit le moins réactif des radicaux libres, son danger provient du fait qu'il soit à l'origine d'espèces réactives très dangereuses comme le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux et le radical hydroxyle (Balaban *et al.*, 2005). Ce radical généré à partir de différentes sources dans les conditions physiologiques et pathologiques (Gardès-Albert *et al.*, 2005) ne traverse pas rapidement la membrane plasmique et se dismute spontanément à pH physiologique pour donner du peroxyde d'hydrogène.

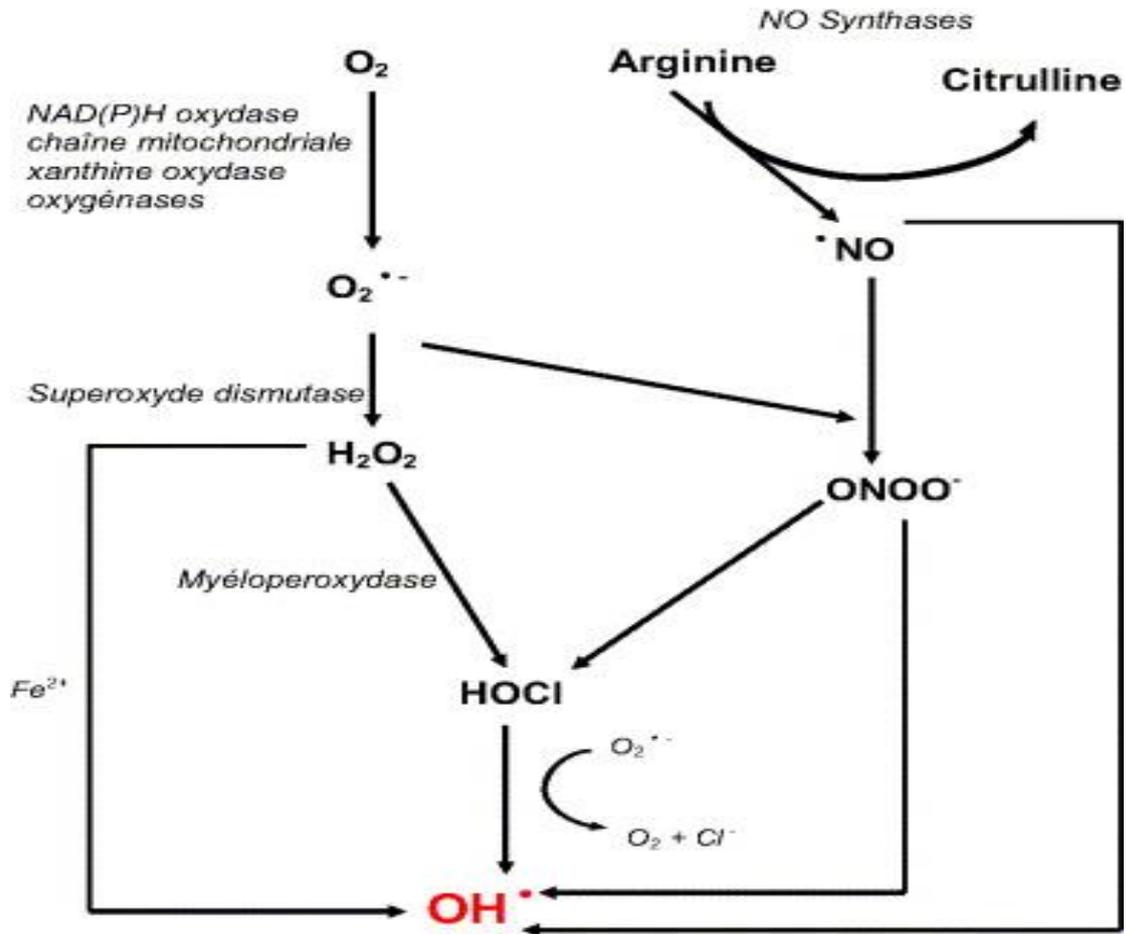


Au cours de l'inflammation, l'anion superoxyde est généré en grande quantité par les neutrophiles et les macrophages, qui au contact avec les agents inflammatoires développent la flambée respiratoire (riche en anion superoxyde) (Jones and Hancock, 2000). Ce processus implique l'activation de la NADPH oxydase membranaire induisant la libération de grandes quantités de ROS.

#### II.1.2. Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Les cellules phagocytaires produisent de grandes quantités d' $H_2O_2$  au cours de l'inflammation. Le peroxyde d'hydrogène est généralement considéré comme une ROS hautement réactive, en particulier dans sa capacité à réagir avec les ions  $Fe^{2+}$  et  $Cu^+$  formant le radical hydroxyl via la réaction de Fenton (Wardman et Candeias, 1996).

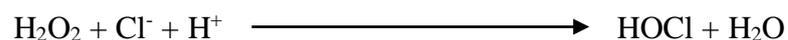




**Figure 5.** Sources cellulaires et interconversions des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Beaudeau *et al.*, 2006).

### II.1.3. Acide hypochloreux (HOCl)

Au cours de l'inflammation, la MPO transforme le peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux (Jones et Hancock, 2000). Ce dernier est un fort agent oxydant, il est 100 à 1000 fois plus toxique que le radical superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène.



Les cibles du HOCl sont l'inactivation enzymatique, l'oxydation des groupements thiols de la membrane plasmique, et la diminution des propriétés d'adhésion de certains composés de la matrice extracellulaire (Genestra, 2007).

#### II.1.4. Radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>)

Le radical hydroxyle est formé à partir du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de l'anion superoxyde par la réaction de Fenton/Haber-Weiss (Blokhina *et al.*, 2003).

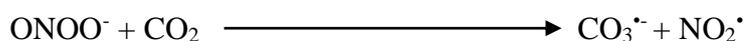


Ce radical est produit durant l'inflammation en grande quantité lors des interactions entre l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et le HOCl, entre le HOCl et le Fe<sup>2+</sup> ou entre le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le NO (Kruidenier et Verspaget, 2002).

L'OH<sup>•</sup> est considéré comme le radical le plus réactif, inactivant la pyruvate-déshydrogénase de la mitochondrie, dépolymérisant le mucus du tractus gastrointestinal ou induisant directement des atteintes oxydatives à l'ADN (Defraigne et Pincemail, 2008).

#### II.1.5. Monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>)

Le NO<sup>•</sup> est une molécule de signalisation, synthétisée par le Nitric Oxide Synthase (NOS). Par sa grande affinité pour le fer, le NO<sup>•</sup> peut moduler l'activité de diverses enzymes à centre hémunique telle que la guanylate cyclase. Il peut également interagir avec l'anion superoxyde pour donner le peroxynitrite (**Figure 5**) qui lui-même peut interagir avec le CO<sub>2</sub> pour former des radicaux carbonate (CO<sub>3</sub><sup>•-</sup>) et dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub><sup>•</sup>) qui peuvent oxyder les protéines ou même l'ADN (Szabo *et al.*, 2007). Le peroxynitrite peut aussi, après protonation, se décomposer en radical OH<sup>•</sup> et en radical dioxyde d'azote NO<sub>2</sub><sup>•</sup>.



#### II.1.6. Peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)

Le peroxynitrite résulte du couplage rapide de l'anion superoxyde et du monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>). Il traverse facilement la membrane plasmique (Marla *et al.*, 1997) et peut soit interagir directement ou indirectement avec les composants de la cellule.

#### II.1.7. Oxygène singulet <sup>1</sup>O<sub>2</sub>

L'oxygène singulet très instable résulte de l'activation photochimique de l'oxygène.



Sa formation peut également être issue de la réaction mettant en jeu le peroxyde d'hydrogène et l'acide hypochloreux (Delattre *et al.*, 2005).



## II.2. Sources des espèces réactives oxygénées

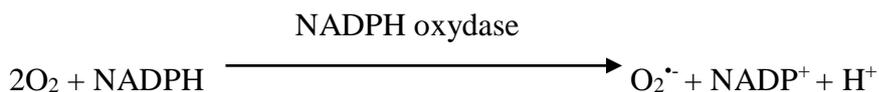
La production des ROS dans la cellule peut faire intervenir plusieurs processus enzymatiques et non enzymatiques.

### II.2.1. Chaîne respiratoire mitochondriale

Des résultats issus d'expériences sur mitochondries isolées ont révélé qu'environ 2 à 3 % des électrons sont perdus par la chaîne respiratoire vont conduire à la formation d'anion superoxyde (Balaban *et al.*, 2005). En plus, la mitochondrie peut produire des ROS par oxydation des monoamines via une oxydase membranaire (Ellis et Triggle, 2003).

### II.2.2. NADPH oxydase

La NADPH oxydase joue un rôle fondamental lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Bedard et Krause, 2007).

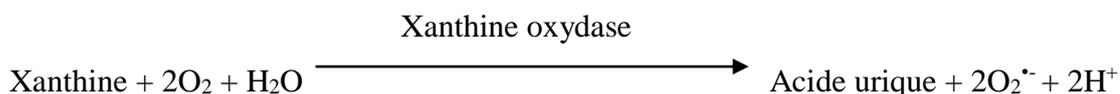


### II.2.3. Nitrique oxyde synthase (NOS)

Les NOS sont des enzymes responsables de la synthèse du monoxyde d'azote ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) lors de la conversion de la L-arginine en L-citrulline. Bien que les NOS soient principalement responsables de la production du  $\text{NO}^{\cdot}$ , elles sont capables de générer l'anion superoxyde (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998).

### II.2.4. Xanthines oxydoréductases

Les xanthines oxydoréductases catalysant la conversion de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique au cours du métabolisme des purines. La forme oxydée (xanthine oxydase) est capable de générer l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Harrison 2002).



### **II.2.5. Myéloperoxydases (MPO)**

Les MPO sont exprimées dans les granules primaires des cellules polynucléaires neutrophiles et des monocytes. Elles possèdent une activité de peroxydation et de chloration. En effet, elles utilisent le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour produire des composés oxydants et catalysent l'oxydation des ions Cl<sup>-</sup> pour former l'acide hypochloreux (HOCl). Les MPO produisent également des composés très réactifs tels que Cl<sup>•</sup>, qui peut générer le radical tyrosyle responsable de la réticulation des protéines (Podrez *et al.*, 1999).

### **II.2.6. Lipoxigénase**

L'acide arachidonique est le substrat de la lipoxigénase pour la synthèse des leucotriènes. Cette synthèse met en jeu une série d'oxydations qui conduisent à la production des ROS (Bianchi *et al.*, 2002).

### **II.2.7. Cytochrome P450**

Dans le réticulum endoplasmique lisse le cytochrome P450 oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques tout en produisant des ROS (Morel *et al.*, 1999). Les cytochromes P450 mitochondriaux possèdent la ferrédoxine qui joue le rôle de donneur d'électrons intermédiaire entre le NADPH et le substrat. Cette réaction est catalysée par la ferrédoxine réductase qui peut être responsable de la formation d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Rapoport *et al.*, 1995).

### **II.2.8. Auto-oxydation des molécules**

L'auto-oxydation de molécules telles que la dopamine, l'adrénaline, les flavines et les hydroquinones est une source de formes réactives de l'oxygène. Le produit direct de ces auto-oxydations est souvent l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Misra *et al.*, 2009).

## **II.3. Conséquences biochimiques du stress oxydant**

Les lipides, les protéines et les acides nucléiques sont des cibles privilégiées des attaques de ROS.

### **II.3.1. Peroxydation lipidique**

En raison de leur haut degré d'insaturation, les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation (Hulbert, 2005; Pamplona *et al.*, 2000). Cette peroxydation des lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong *et al.*, 2004). L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. Elle fournit une grande variété de

produits actifs qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Théron et Blache, 2005), pour donner des produits spécifiques utilisés comme indicateurs de la peroxydation tels que le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbituriques (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) (Valko *et al.*, 2006).

### **II.3.2. Oxydation des protéines**

Les protéines sont susceptibles d'être oxydées par les ROS. Les réactions de cette oxydation sont influencées par le  $\text{Cu}^{2+}$  et le  $\text{Fe}^{2+}$  et peuvent soit, rompre les liaisons peptidiques modifiant ainsi la chaîne protéique, soit qu'ils provoquent des modifications par l'addition de produits issus de la peroxydation. Ces changements conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures : perte de la fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases ...etc. (Levine, 2002).

Les principaux produits de l'oxydation des protéines sont les carbonyles qui sont utilisés comme marqueurs du stress oxydant. L'oxydation des protéines est impliquée dans plusieurs pathologies telles que l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives, la dystrophie musculaire, l'ischémie-reperfusion, le vieillissement (Stadtman et Levine, 2003).

### **II.3.3. Oxydation de l'ADN**

L'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques sont les altérations les plus communes de l'ADN nucléaire et mitochondrial attaqué par les ROS. Une des altérations fréquentes de l'ADN est l'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle formant la 8-hydroxy-guanine (8-OHG). Ce produit est considéré comme un marqueur de lésions nucléiques et de carcinogénèse (Cadet *et al.*, 2002). Comme pour les autres composés, la majorité des altérations oxydatives de l'ADN sont induites par le radical hydroxyle. Lorsque le  $\text{H}_2\text{O}_2$  échappe aux enzymes de régulation, il peut rejoindre le noyau de la cellule et réagir avec les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^+$  associés à la chromatine générant ainsi le radical hydroxyle *in situ*, qui attaque l'ADN proche (Kruidenier et Verspaget, 2002).

### **II.3.4. Oxydation des glucides**

Le glucose et les protéoglycanes du cartilage sont les cibles glucidiques préférentielles des ROS. L'oxydation du glucose se fait selon deux mécanismes possibles : soit l'oxydation directe du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine pour aboutir à la formation de produits finaux de glycosylation (PFG), soit la formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine pour donner

une protéine glyquée susceptible d'être attaquée par des ROS pour former des PFG. Ces derniers en présence de métaux de transition favorisent la libération d' $O_2^{\cdot-}$  et fragilisent les parois vasculaires et la rétine chez les patients diabétiques (Halliwell et Gutteridge, 1999).

## **II.4. Effets pathologiques du stress oxydant**

Le stress oxydant est impliqué dans la genèse de plusieurs pathologies chroniques ou dans leurs complications. Il semble que le stress oxydatif est un facteur causal et aggravant de la sénescence. Le vieillissement cellulaire est aussi le résultat d'un déséquilibre chronique oxydants/antioxydants et des processus de réparation cellulaire.

Le stress oxydant semble être impliqué dans de multiples maladies liées au vieillissement, telles que la maladie d'Alzheimer, l'artériosclérose, la cataracte (Favier, 2006; Mates et Sanchez-Jimenez, 1999) et les affections cardiovasculaires (Pincemail, 1999).

Les dommages cellulaires causés par les ROS sont d'intensité variable, proportionnelle à leur taux de production et à leur durée d'action. En effet, Ils peuvent être :

- Transitoires (mécanisme de destruction des bactéries pathogènes).
- Chroniques modérés caractérisant diverses pathologies comme les maladies vasculaires, neurodégénératives (alzheimer, parkinson), rhumatoïdes (arthrite, sclérose amyotrophique), broncho-pulmonaires (asthme, emphysème).
- Chroniques aiguës c'est le cas de la destruction cellulaire par nécrose et apoptose (Bonfont-Rousselot, 2002).

## **II.5. Systèmes antioxydants**

Afin de préserver un équilibre du statut redox, les cellules disposent de systèmes de défenses antioxydants enzymatiques et non-enzymatiques. La défense enzymatique est reconnue comme étant la plus efficace. Les composés antioxydants sont des substances qui, à faible concentration retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat. (Halliwell, 1999).

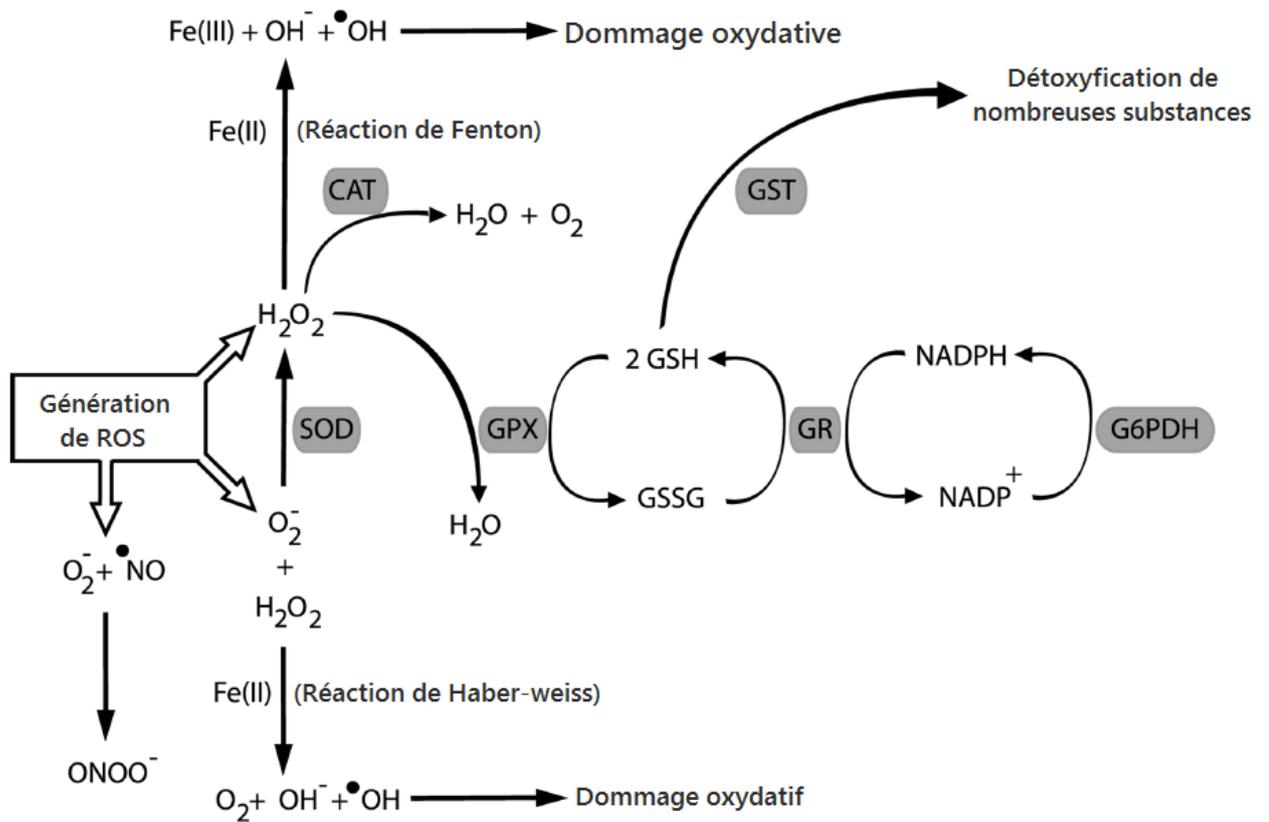
### **II.5.1 Systèmes antioxydants enzymatiques**

Les antioxydants enzymatiques représentent la composante la plus importante des systèmes de défense cellulaires contre les attaques oxydatives (**Figure 6**).

#### **II.5.1.1. Superoxyde dismutase (SOD)**

La SOD est la première défense enzymatique contre les ROS, elle assure la dismutation du radical  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  permettant ainsi à l'organisme un contrôle du taux de  $O_2^{\cdot-}$

intracellulaire (Abreu et Cabelli, 2010). Il existe plusieurs types de SOD, à savoir, les SOD cuivre/zinc (Cu/Zn SOD) dont l'une est cytosolique et l'autre est extracellulaire. Ces deux formes sont retrouvées aussi bien chez les eucaryotes que chez les bactéries. La SOD manganèse (Mn-SOD) est présente dans les mitochondries et permet de protéger celles-ci des radicaux  $O_2^{\cdot-}$  qu'elles génèrent. Une quatrième forme est la Fe-SOD qui est une SOD uniquement procaryotique (Théron et Bonnefont-Rousselot, 2005).



**Figure 6.** Principales enzymes antioxydantes. La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR), la glutathion S-transférase (GST), le glutathion sous sa forme réduite GSH et oxydée GSSG. (Hermes-Lima, 2005).

### II.5.1.2. Catalase (CAT)

La catalase est une enzyme abondante dans le foie, les globules rouges, dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol (Diaz *et al.*, 2012). Elle catalyse la décomposition du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . Les concentrations élevées de  $H_2O_2$  intracellulaires entraînent une activation préférentielle de la catalase, tandis que les faibles concentrations seront prises en charge par la glutathion peroxydase. Ces mécanismes sont très complémentaires (Pamplona et Costantini, 2011).

### **II.5.1.3. Glutathion peroxydase (GPX)**

La glutathion peroxydase (GPx) agit en synergie avec la SOD, puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lors de cette réaction 2 molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées (GSSG) (Brigelius-Flohe et Kipp, 2009). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique (Nomura *et al.*, 2000).

### **II.5.1.4. Glutathion Réductase (GR)**

La GR régénère le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH, utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de le réduire constamment pour que la GPx maintienne sa fonction. Ces deux enzymes sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries (Valko *et al.*, 2007).

### **II.5.1.5. Peroxyrédoxines**

Les peroxirédoxines (Prx) forment une famille de peroxydases à groupement thiol capables de réduire les peroxydes. Il existe 6 isoformes de Prx localisés principalement dans le cytoplasme et les mitochondries. Leur activité catalytique est plus faible que celle de la catalase ou des GPx mais elles possèdent une forte affinité pour le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les Prx pourraient ainsi être plus efficaces pour éliminer des niveaux faibles de peroxyde d'hydrogène (Rhee *et al.*, 2005).

## **II.5.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques**

Les antioxydants non-enzymatiques, sont soit d'origine endogène (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinol...etc.) soit exogène apportés par l'alimentation (vitamines, polyphénols, caroténoïdes... etc.).

### **II.5.2.1. Antioxydants non enzymatiques d'origine endogène**

#### **a) Glutathion (GSH)**

Le glutathion est un tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes (Li *et al.*, 2004). Il peut régénérer la vitamine E et réagir avec les radicaux OH<sup>•</sup> et O<sub>2</sub><sup>•-</sup> directement et ainsi interrompu la chaîne d'oxydation. Il se présente alors sous la forme d'un radical GS<sup>•</sup> et se lie à une autre molécule de glutathion radicalaire pour former le glutathion oxydé sous forme disulfure (GSSG). Le ratio GSH/GSSG est souvent utilisé comme marqueur du niveau d'oxydation

d'une cellule. Le maintien d'un niveau élevé de glutathion est essentiel pour prévenir les dégâts oxydatifs (Hermes-Lima, 2005).

#### b) Bilirubine

La bilirubine est un produit du catabolisme de l'hémoglobine. Il se lie à l'albumine et empêche sa pénétration dans les tissus riches en lipides. La bilirubine est un piègeur d'oxygène singulet et de radicaux peroxydes, il protège ainsi l'albumine et les acides gras qui y sont associés des attaques radicalaires (Théron et Bonnefont-Rousselot, 2005).

#### c) Acide urique

L'acide urique est le produit de l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine par la xanthine oxydoréductase. A pH physiologique, il est sous forme ionisée pouvant interagir avec les radicaux hydroxyles et conduisant à la formation de l'espèce radicalaire  $UrH^{\bullet}$  stable, qui peut être réduite par l'ascorbate pour régénérer l'acide urique. L'acide urique protège les protéines de la nitration en réagissant avec le peroxy-nitrite, comme il peut chélater les ions métalliques (Whiteman *et al.*, 2002).

#### d) Ubiquinones et Cytochrome C

Les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouent un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a été rapporté que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant (Power et Lennon, 1999). L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxydes. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS (Packer *et al.*, 1997).

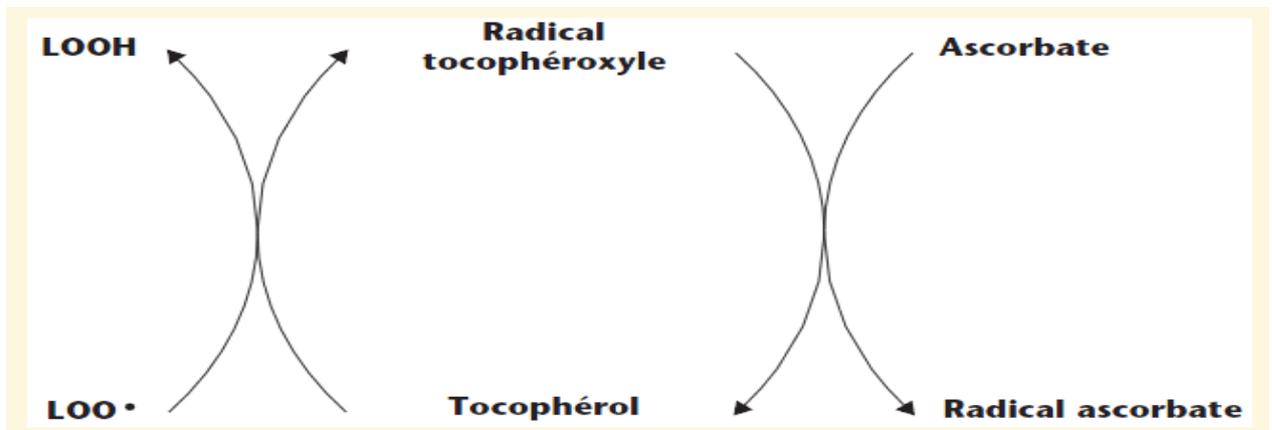
Le cytochrome C présent dans l'espace intermembranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre d' $O_2^{\bullet-}$  produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome C oxydé et de l' $H_2O$  (Skulachev, 1998).

### **II.5.2.2. Antioxydants non enzymatiques d'origine exogène**

#### a) Vitamines E et C

La vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol) est le principal antioxydant liposoluble dans le plasma et les érythrocytes. Situé dans les lipoprotéines et les membranes, il est capable de piéger l'oxygène singulet et de réagir avec le radical hydroxyle et former le radical tocophéryle. L' $\alpha$ -tocophérol

peut être régénéré lors de la réduction du radical tocophéryle (**Figure 7**) par la vitamine C (Brigelius-Flohe *et al.*, 1999). Ce dernier est le plus fréquemment présent sous forme d'ascorbate et est considéré comme l'antioxydant le plus important des fluides extracellulaires. C'est un piègeur très efficace de l'ensemble des ROS. Il réagit particulièrement avec les peroxydes aqueux en formant le radical ascorbyle ce qui protège les lipoprotéines et les membranes de la peroxydation lipidique (Roussel *et al.*, 2005).



**Figure 7.** Régénération de la vitamine E par l'acide ascorbique (Guilland, 2011).

#### b) Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules liposolubles capables de réagir avec les radicaux libres par le transfert d'électron ou d'hydrogène ou par liaison avec un radical. Ils sont capables de régénérer la vitamine E et sont eux-mêmes régénérés par la vitamine C (Hermes-Lima, 2005).

#### c) Oligoéléments

Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un oligoélément comme cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPx de sélénium. Cependant, certains d'entre eux comme le fer, lorsqu'ils sont en excès peuvent avoir une action prooxydante via les réactions de Fenton et Haber-Weiss (Roussel, 2009).

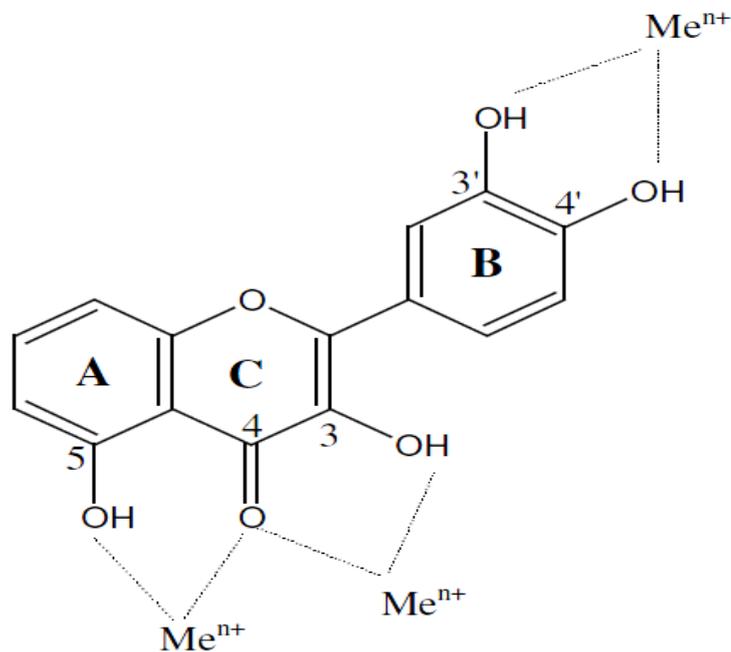
#### d) Polyphénols

Les polyphénols, naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation, peuvent agir en tant qu'antioxydants selon divers mécanismes (Shahidi *et al.* 2003).

i) Inhibition des enzymes par action directe sur la protéine ou par action sur leur transcription (Havesteen, 2002).

ii) Chélation des ions métalliques : divers polyphénols sont considérés comme de bons chélateurs des ions métalliques (Brown *et al.*, 1998). Les études menées par Van Acker *et al.* (1996) sur la chélation des ions du fer par certains flavonoïdes ont mis en évidence les sites essentiels (groupement 3'-hydroxy et 4'-hydroxy du cycle B, les groupements 3-hydroxy et 4-oxo du cycle C, et les groupements 4-oxo et 5-hydroxy du cycle A) pour la chélation des ions métalliques (**Figure 8**).

iii) Piégeage des radicaux libres : les polyphénols, plus particulièrement les flavonoïdes (Fl-OH), sont capables de réduire rapidement les radicaux superoxydes, peroxydes (ROO<sup>•</sup>), alkoxydes (RO<sup>•</sup>) et hydroxyle par transfert d'hydrogène (Jovanovic *et al.*, 1994) :



**Figure 8.** Sites probables de la chélation des ions métalliques (Me<sup>n+</sup>) par les flavonoïdes (Van Acker *et al.*, 1996).

### III. LA PLANTE *ANACYCLUS CLAVATUS* (DESF.) PERS.

*Anacyclus clavatus* (desf.) pers. est une plante herbacée de la famille des Astéracées. Communément connue par Anacycle en massue, en Algérie, elle est connue sous le nom Gartoufa.

#### III.1. Aspect botanique et classification

*Anacyclus clavatus* est largement distribuée dans les pays méditerranéens, elle s'adapte aux environnements humides et ouverts, et se développe habituellement aux bords des routes et des champs (Quezel et Santa, 1963). En Algérie le genre *Anacyclus* est représenté par deux espèces, à savoir *Anacyclus pyrethrum* L. et *Anacyclus clavatus* Pers. (Julien, 1894).

*Anacyclus clavatus* est une plante annuelle herbacée verte-blanchâtre (**Figure 9**), avec un cycle végétatif très court fleurissant entre avril et juin, pubescente de 20 à 50 cm, à tige de 20-40 cm, les feuilles sont bipennatiséquées à segments très étroits. Les fleurs sont hétérogames et recueillies dans des capitules terminaux rayonnés de 2.5 à 3 cm de diamètre. Selon Cronquist (1981) sa classification est comme suit :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Anacyclus*

Espèce : *Anacyclus clavatus* (desf.) pers

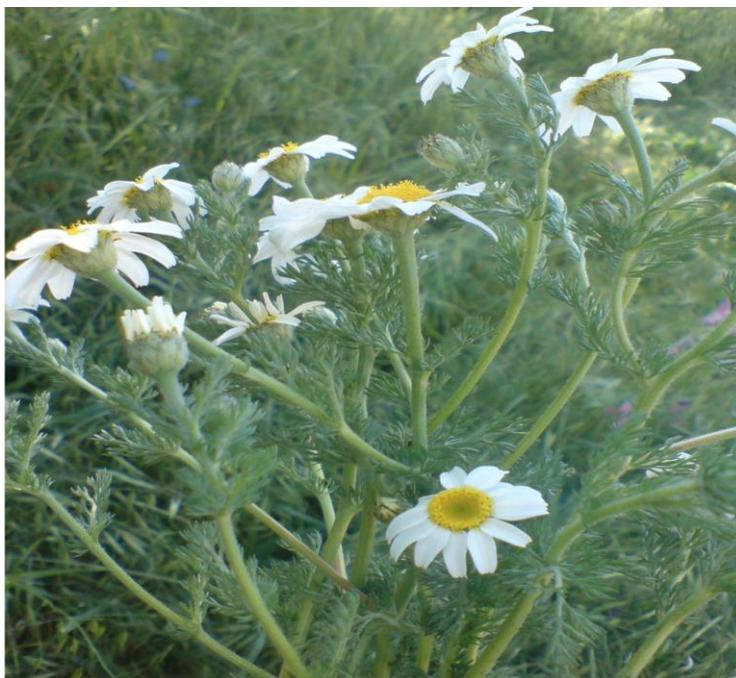
#### III.2. Usage traditionnel

Plusieurs espèces d'*Anacyclus* ont été utilisées en médecine traditionnelle, comme par exemple, *Anacyclus pyrethrum*, *Anacyclus radiatus*, *Anacyclus valentinus*, *Anacyclus cyrtolopodioide*, et *Anacyclus clavatus*. *Anacyclus clavatus* est connue depuis l'antiquité pour ses propriétés médicinales. Ses feuilles et ses tiges sont utilisées comme aliments dans les salades ou compote et comme tisanes digestives (Tardío, 2006; Pardo de Santayana et Morales, 2010) et comme drogue active contre les troubles digestifs (Benitez, *et al.*, 2010) et les ulcères gastriques (Pottier Alapetite, 1981). Elle est également utilisée sous forme de plâtre comme anti-inflammatoire (Pardo de Santayana et Morales, 2010). Les racines sont

utilisées pour traiter diverses pathologies, elles sont particulièrement efficaces contre les infections de la peau, notamment les maladies fongiques.

### III.3. Etude phytochimique

*Anacyclus clavatus* a fait l'objet de peu d'études chimiques. La présence de flavonoïdes et terpénoïdes a été montrée (Harald, 1978; Benitez *et al.*, 2010) . Les huiles essentielles des parties aériennes ont été analysées et un total de 98 et 106 composés volatils ont été identifiés (Aliboudhar *et al.*, 2013). Le Germacrène D est le constituant majeur des huiles essentielles des feuilles et des tiges suivie par  $\delta$ -élémane puis  $\alpha$ -caryophyllène, tandis que le  $\beta$ -thuyone est le principal constituant des fleurs suivie par le monoterpène artemisia cétone puis le myrténal. En outre, le 1,8-cinéole, myrténol, terpinène-4-ol,  $\alpha$ -cadinol, muurolol,  $\alpha$ - $\beta$  pinène,  $\beta$ -terpinène et le myrcène sont présents dans les huiles essentielles d'*Anacyclus clavatus* (Aliboudhar *et al.*, 2013).



**Figure 9.** Photographie montrant l'aspect morphologique de la plante *Anacyclus clavatus*.

### III.4. Propriétés biologiques

Des activités antioxydante, antiinflammatoire, antibactérienne, antifongique, antidiabétique ainsi qu'insecticide ont été signalées pour l'*Anacyclus pyrethrum*, une espèce du même genre que l'*Anacyclus clavatus*.

Les études de Hammami *et al.* (2012) ont montré que les huiles essentiels d'*Anacyclus clavatus* possèdent une activité antibactérienne envers *Pseudomonas aeruginosa*, et une activité antifongique plus importante contre *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida*

*krusei* et *Candida parapsilosis*. Selles *et al.* (2012) ont montré que l'*Anacyclus pyrethrum* dispose de propriétés bactériostatiques vis-à-vis de *Listeria monocytogenes*, *Bacillus Cereus* et *Staphylococcus aureus*. Ces mêmes auteurs ont rapporté que l'extrait méthanolique de la partie aérienne de l'*Anacyclus pyrethrum* possède un effet antioxydant remarquable en piégeant le radical DPPH avec IC<sub>50</sub> de 0.056 mg/ml et un pouvoir réducteur important avec une IC<sub>50</sub> de 0.10 mg/ml. L'extrait méthanolique de feuilles et des tiges et l'extraits acétonique de fleurs ont montré une activité anti-radicalaire très élevée envers Les radicaux DPPH (Aliboudhar *et al.*, 2013).

L'activité anti-inflammatoire des extraits d'*Anacyclus clavatus* a été évaluée en examinant leur capacité à inhiber la synthèse des cytokines stimulée par iNOS. Rimbau *et al.* (1999) ont montré que les extraits aqueux, méthanolique et chloroformique de *Anacyclus pyrethrum* possède une activité anti-inflammatoire en inhibant l'œdème de l'oreille des rats induit par l'acide arachidonique ou par la carragénine. L'activité anti-diabétique et l'effet sur la prolifération de cellules endothéliale ont été aussi rapportés (Local Food-Nutraceuticals Consortium, 2005).

Les huiles essentielles de l'*Anacyclus clavatus* ont été testés pour des propriétés anticancéreuses, en particulier l' $\alpha$ -cadinol, qui a montré une toxicité sélective contre les cellules humaines d'adénocarcinome du côlon (Sylvestre, 2006). Le  $\beta$ -élémane a été utilisé comme médicament anti-tumoral (Yi-Qun, 2008). Le 1,8-cinéole, terpinène-4-ol et  $\alpha$ -terpinène qui sont présents dans les huiles essentielles ont une grande activité insecticide (Lee, 2004).

# MATERIEL ET METHODES

# MATERIEL ET METHODES

## I. Matériel

### I.1. Animaux

Des souris *Swiss albinos* mâles et femelles, de poids variant entre 25 et 30 g, ainsi que des rats femelles *Albinos Wistar* pesant entre 170 et 210 g ont été utilisées dans cette étude. Ces animaux ont été procurés auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Des groupes comportant 7 rats ou 10 souris ont été hébergés dans des cages de polypropylène à une température ambiante, avec accès libre à l'eau et à une alimentation standard fournie par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Béjaia. Les animaux sont adaptés pendant 7 jours avant leur utilisation.

### I.2. Matériel végétal

La plante *Anacyclus clavatus* (*A. clavatus*) a été récoltée au mois de mai 2012 de la région de Bougâa, Sétif. L'identification a été faite par Dr. Boulachab N. (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Sétif 1). La partie aérienne a été séchée à l'ombre et à température ambiante puis stockée à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

### I.3. Produits et Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans la présente étude sont : Indométacine, ferrosine [3-(2-pyridyl)-5, 6-bis (4-phenyl-sulfonicacid)-1, 2, 4-triazine], chlorure ferreux ( $\text{FeCl}_2$ ), ( $\text{FeCl}_3$ ), acide ethylenediamine tétraacétique (EDTA), acide trichloracétique (TCA), thiocyanate de potassium (KCN), 1,1- diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), réactif de Folin-Ciocalteu, acide gallique, acide tannique, quercétine, ferricyanide de potassium [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ],  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Tween 20,  $\lambda$  carragénine, carboxyméthyl cellulose (CMC), aspirine et huile de croton provenant de sigma (Allemagne). Acide linoléique et 2,6 di-tert-butyl-4-méthyl phenol (BHT) proviennent de Fluka (France). Les sels utilisés pour la préparation des tampons sont obtenus auprès de Panreac (Espagne). Les solvants sont de grade analytique et obtenus auprès de Riedel-de Haën, Prolabo et Sigma.

### I.4. Solutions de travail

- Solution de l'huile de Croton 5,33 mg/ml : préparée en solubilisant l'huile de croton dans l'acétone. Ensuite l'eau distillée est ajoutée jusqu'à l'obtention du rapport acétone/eau (1:1).

- Solution tampon PBS : préparée en mélangeant progressivement la solution de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (50 mM) avec la solution de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (50 mM) jusqu'à l'obtention d'un pH égale à 7,4. Le mélange obtenu est ensuite supplémenté par du NaCl (150 mM).
- Les solutions de l'extrait méthanolique et aqueux d'*Anacyclus clavatus* et de l'indométacine utilisées *in vivo* sont fraîchement préparées dans du NaCl 0.9%.
- Acide gallique (200 µg/ml) : préparé dans l'eau distillée.
- Carbonate de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7,5 %) : préparé dans l'eau distillée.
- Réactif de Folin : dilué au 1/10 avec de l'eau distillée.
- Quercétine (100 µg/ml) : préparée dans le méthanol.
- $\text{AlCl}_3$  (2 %) : préparé dans le méthanol.
- Acide tannique (2 mg/ml) : préparé dans le méthanol.
- Solution de DPPH (0,1 mM) : préparée dans l'éthanol.
- BHT (2 mg/ml) : préparé dans le méthanol.
- Ferrosine (5 mM) : préparée dans le méthanol 80%.
- $\text{FeCl}_2$  (0,6 mM) : préparée dans l'eau distillée (pour test de chélation du fer ferreux).
- $\text{FeCl}_2$  (0,4%) : préparé dans de l'HCl 3,5% (pour test de peroxydation de l'acide linoléique).
- EDTA (1 mg/ml) : préparé dans l'eau distillée.
- Thiocyanate de potassium (30 %) : préparé dans l'eau distillée.
- $\text{FeCl}_3$  (0,1 %) : préparé dans l'eau distillée.
- TCA (10 %) : préparé dans le tampon PBS (0.2 M, pH 6,6).
- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1% : préparé dans le tampon PBS (0.2M, pH 6,6).
- Carragénine 1% : préparé dans le NaCl 0.9 % stérile.
- Aspirine (200 mg/kg) : préparé dans du NaCl 0.9 % contient 1 % du CMC.

## **II. Méthodes**

### **II.1. Préparation de l'extrait aqueux**

L'extrait aqueux est préparé selon la méthode de Ferreira *et al.* (2006). 50g de poudre de la partie aérienne broyée sont mis à bouillir pendant 20 minutes dans 500 ml d'eau distillée. Après filtration, l'extrait récupéré est soumis à une centrifugation. La solution obtenue est séchée pour obtenir une poudre brune foncée qui est conservée à  $-32^\circ\text{C}$  jusqu'à son utilisation.

### **II.2. Préparation de l'extrait méthanolique**

L'extrait méthanolique est préparé selon la méthode de Mohamed et Naghibi (2010). La partie aérienne est broyée puis soumise à macérer dans un mélange méthanol/eau (8 : 2 V/V) à un rapport de 10g/100 ml sous agitation douce pendant 24 heures à température ambiante.

Le mélange est filtré et le filtrat est conservé à 4°C tandis que le précipité est soumis à une deuxième macération avec un mélange méthanol/eau (5:5 V/V). Les deux filtrats sont mélangés puis soumis à une évaporation du méthanol sous pression réduite à 45°C dans un rotavapeur (BÜCHI). Après séchage, la poudre brune foncée obtenue est conservée à -32°C jusqu'à son utilisation.

### II.3. Dosage des polyphénols totaux

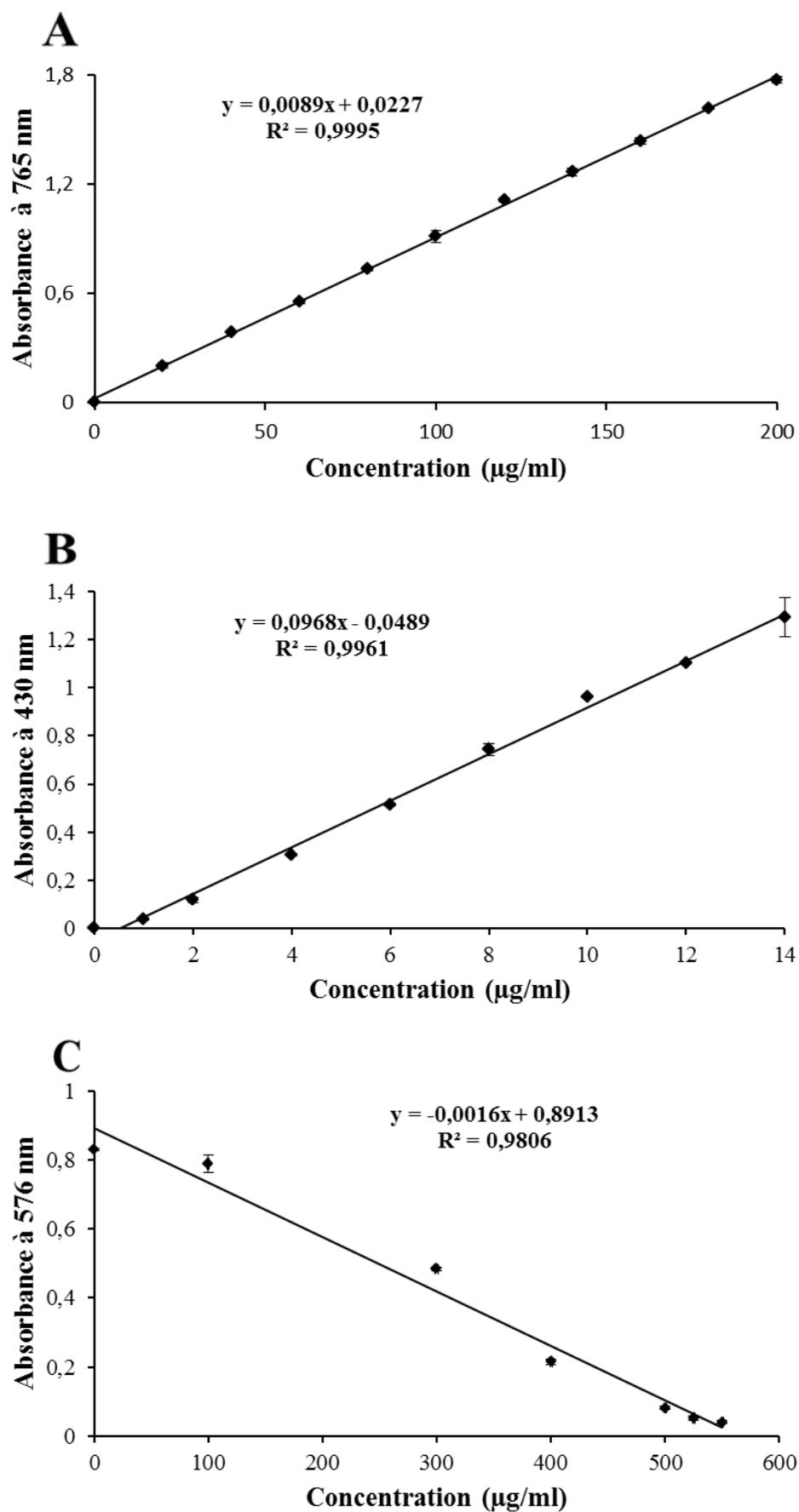
La teneur en composés phénoliques des extraits d'*Anacyclus clavatus* a été estimée par la méthode au Folin-Ciocalteu décrite par Li *et al.* (2007). Cette méthode se base sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique phosphomolybdique du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation des produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm, l'intensité étant proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé *et al.*, 2005). Brièvement, Un volume de 100 µl des solutions d'extraits à différentes concentrations sont ajoutées à 500 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (10%). Après 4 min, 400 µl de carbonates de sodium (75 g/l) sont additionnés. Le mélange est laissé réagir pendant 2 heures à température ambiante, puis la lecture est faite à 765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage (**Figure 10A**) établie avec l'acide gallique (0 - 200 µg/ml) et est exprimée en µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

### II.4. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des 2 extraits a été estimée par la méthode décrite par Bahorun *et al.* (1996). Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle libre en position susceptible de donner, en présence de chlorure d'aluminium, un complexe jaunâtre par chélation de l'ion  $Al^{+3}$ . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (Basli *et al.*, 2012). Un millilitre de la solution d' $AlCl_3$  (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de l'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) contenant différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min puis la lecture est faite à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes dans les extraits est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-14 µg/ml) et exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait) (**Figure 10B**).



**Figure 10.** Droite d'étalonnage de l'acide gallique (A), de la quercétine (B) et de l'acide tannique (C).

## II.5. Dosage des tannins

La détermination de la teneur en tannins des extraits aqueux et méthanolique d'*Anacyclus clavatus* est réalisée par le test de précipitation de l'hémoglobine en utilisant le sang frais des bovins suivant la méthode décrite par Hagerman et Butler (1989). Brièvement, un volume de sang hémolysé est mélangé avec un volume de la solution des extraits ou d'acide tannique à différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 20 min à température ambiante, puis soumis à une centrifugation (4000 rpm /10 min à 4°C). La lecture est faite à 576 nm contre l'eau distillée. Une gamme d'étalonnage est établie avec l'acide tannique (0-550 µg/ ml) (**Figure 10C**). La teneur en tannins des extraits est exprimée en microgramme d'équivalents d'acide tannique par milligramme d'extrait. Le taux de précipitation de l'hémoglobine des 2 extraits est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de précipitation (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

$A_c$  : absorbance du contrôle.

$A_t$  : Absorbance du test.

## II.6. Activité anti-inflammatoire des extraits d'*Anacyclus clavatus*

### II.6.1. Induction de l'œdème de l'oreille par l'huile de croton chez la souris

L'œdème de l'oreille est induit par l'huile de croton, selon la méthode de Manga *et al.* (2004). Les souris reçoivent 15 µl d'une solution acétone-eau (1:1) contenant 80 µg d'huile de croton par application locale sur la face interne de l'oreille droite à l'aide d'une micropipette. Les groupes de souris traités ont reçu localement les 2 extraits à 2 mg/oreille et 0,5 mg/oreille d'indométacine, simultanément avec l'agent phlogogénique. Les souris du groupe témoin reçoivent uniquement la solution de l'huile de croton.

L'épaisseur de l'oreille est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse digital avant le traitement et 6 heures après l'induction de l'inflammation. La différence de l'épaisseur est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ Traité} / \Delta \text{ Témoin}) \times 100$$

### II.6.2. Induction de l'œdème de la patte par la carragénine chez le rat

L'œdème plantaire est induit par la carragénine selon la méthode de Winter *et al.* (1962). Les rats des groupes traités ont reçu par voie orale les extraits méthanolique et aqueux aux doses de 200 et 400 mg/kg et l'aspirine (200 mg/kg) une heure avant l'induction de l'inflammation par l'injection de 0,1 ml de la carragénine à 1% sous l'aponévrose plantaire de

la patte postérieure droite du rat. Cependant, les rats du groupe témoin (contrôle positive) ont reçu oralement 2 ml d'une solution de NaCl 0.9 % une heure avant l'induction de l'inflammation.

La taille de l'œdème a été suivie par la mesure du volume de la patte enflammée 6 heures après l'injection de l'agent phlogogène à l'aide d'un pléthysmomètre (UGO Basile, Allemagne). La différence de volume avant et après l'injection de la carragénine est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = (\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ Traité} / \Delta \text{ Témoin}) \times 100$$

### II.6.3. Induction de la pleurésie chez le rat

La pleurésie induite par la carragénine chez le rat a été évaluée selon la méthode de Cuzzocrea *et al.* (2002). Dans cette étude, des groupes de 5 à 7 rats sont utilisés. Les rats traités ont reçu par voie orale 2 ml d'extrait méthanolique ou aqueux d'*Anacyclus clavatus* (400 mg/kg) ou de l'aspirine (200 mg/kg) 1 heure avant l'injection de 0.2 ml de la carragénine à 1% dans la cavité pleurale. Les rats du groupe témoin (contrôle positif, C<sup>+</sup>) ont reçu 2 ml de NaCl 0.9% par voie orale 1 heure avant l'injection de la carragénine.

Une incision dermique au niveau du sixième espace intercostal droit des rats légèrement anesthésiés est pratiquée, ensuite 0,2 ml de la carragénine (1%) sont injectés dans la cavité pleurale. L'incision est refermée par des points de suture et l'animal est réanimé. Quatre heures plus tard, les rats sont asphyxiés par une forte dose de chloroforme. Leur cage thoracique est prudemment ouverte, la cavité pleurale est ensuite rincée par 2 ml de NaCl 0.9 % stérile contenant de l'EDTA afin de récupérer l'exsudat qui s'est formé. Le volume de l'exsudat produit par chaque animal est déduit en appliquant la formule suivante :

$$V_{\text{ex}} = V_{\text{t}} - V_{\text{s}}$$

$V_{\text{ex}}$  : volume de l'exsudat.

$V_{\text{t}}$  : volume total récupéré.

$V_{\text{s}}$  : volume de la solution de lavage.

Afin de récupérer les PMNs ayant migrés vers la cavité pleurale de chaque rat, les exsudats sont soumis à une centrifugation à 1000 rpm pendant 10 min à 4°C. Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) sont alors récupérés dans le culot. Les hématies sont éliminées par une hémolyse rapide par addition de 1 ml d'eau distillée fraîche. Après 30 secondes 5 ml de PBS frais sont ajoutés. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à

1000 rpm/10 min à 4°C. Cette opération est répétée 2 ou 3 fois pour obtenir un culot blanc. Les PMNs récupérés dans le culot sont suspendus dans le PBS et gardés dans la glace. Le nombre de PMNs de l'exsudat est déterminé par comptage à l'aide d'une cellule de Thoma. Pour cela, 50 µl de la suspension cellulaire sont mélangés à 450 µl de la solution turk (1/10). Une goutte de la suspension cellulaire colorée est ensuite déposée à l'aide d'une micropipette, contre une lamelle montée sur la cellule de Thoma. Les PMNs sont comptés dans les 16 carreaux de la cellule à l'aide de l'objectif X10 d'un microscope (Zeiss, Germany). La concentration cellulaire est ensuite déduite par la formule suivante :

$$[C] = N \times 10 \times 10^4$$

[C] : Nombre des cellules/ml.

N : Nombre de cellules comptées dans les 16 carreaux.

10 : Le facteur de dilution.

10<sup>4</sup> : Facteur spécifique de la cellule de Thoma, utilisé pour obtenir le nombre de cellules dans 1 ml.

Les pourcentages d'inhibitions de la migration des PMNs dans la cavité pleurale des rats traités sont calculés par rapport au groupe contrôle (non traité) considéré comme le 100% de migration en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (N_c - N_t / N_c) \times 100$$

N<sub>c</sub> : Nombre de PMNs récupérés dans la cavité pleurale des rats contrôles.

N<sub>t</sub> : Nombre de PMNs récupérés dans la cavité pleurale des rats traités.

## II.7. Activité antioxydante des extraits d'*Anacyclus clavatus*

### II.7.1. Effet piègeur du radical libre DPPH<sup>•</sup>

L'activité antiradicalaire des extraits d'*Anacyclus clavatus* a été évaluée selon le protocole décrit par Que *et al.* (2006), en utilisant le DPPH<sup>•</sup> comme un radical libre stable. Dans ce test, les antioxydants comme donneur de proton réduisent le diphényl picryl hydrazyle ayant une couleur violette en diphényl picryl hydrazine avec une couleur jaune, dont l'intensité est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants. Un volume de 500 µl de la solution de DPPH<sup>•</sup> (0.1mM) est ajouté à 500 µl des solutions d'extraits ou standard (BHT) à différentes concentrations, le mélange est incubé à l'obscurité pendant 30 min puis l'absorbance est lue à 517 nm. Le contrôle contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol. L'activité antiradicalaire est déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

A<sub>c</sub> : Absorbance du contrôle.

A<sub>t</sub> : Absorbance du test.

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, 2 autres paramètres sont calculés : la concentration effectrice à 50% ( $EC_{50} = IC_{50}/\text{mg de DPPH/ml}$ ) et le pouvoir antiradicalaire (APR) qui n'est que l'inverse de l' $EC_{50}$  ( $APR = 1/EC_{50}$ ).

### II.7.2. Chélation du fer ferreux

Le pouvoir chélateur des 2 extraits étudiés a été déterminé selon la méthode de Le *et al.* (2007) qui se base sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrosine après traitement des échantillons avec les ions  $Fe^{2+}$ . Des solutions d'extraits et de l'antioxydant de référence (700  $\mu\text{l}$ ) à différentes concentrations sont initialement mélangées avec 50  $\mu\text{l}$  de  $FeCl_2$  (0.6 mM). Après 5 min, 50  $\mu\text{l}$  de Ferrosine (5 mM) sont additionnées au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laissé réagir pendant 10 min à température ambiante, le contrôle contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol.

Les lectures sont effectuées à 562 nm et l'effet séquestrant des échantillons vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100$$

$A_c$  : Absorbance du contrôle.

$A_t$  : Absorbance du test.

Pour mieux exprimer l'efficacité des extraits, leur activité chélatrice est exprimée en mg d'équivalent EDTA/g d'extrait.

### II.7.3. Peroxydation de l'acide linoléique

L'activité antioxydante totale des extraits étudiés est déterminée selon la méthode de thiocyanate ferrique décrite par Gulcin *et al.* (2005) avec de légères modifications. Premièrement, une émulsion d'acide linoléique est préparée en mélangeant 0,028 g d'acide linoléique, 0,028 g de Tween 20 et 10 ml de solution tampon phosphate (0,04 M, pH 7.0). Le milieu réactionnel contient 600  $\mu\text{l}$  de solutions d'extraits ou de l'antioxydant standard (BHT) à une concentration bien définie (50  $\mu\text{g/ml}$ ) et 600  $\mu\text{l}$  de l'émulsion d'acide linoléique. Le contrôle contient tous les réactifs sauf l'échantillon à tester (extraits ou antioxydant standard) qui est remplacé par un volume égal de la solution tampon. Après agitation, le mélange est incubé à 25°C à l'obscurité. La lecture est faite après 15 min d'incubation puis chaque 24 heures pendant 96 heures, en mélangeant 1ml d'éthanol, 20  $\mu\text{l}$  KCN, 20  $\mu\text{l}$  d'échantillon et 20

$\mu\text{l}$  de  $\text{FeCl}_2$  et après 3min, l'absorbance est lue à 500 nm contre un blanc d'éthanol. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition de la peroxydation (\%)} = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100$$

$A_c$  : Absorbance du contrôle.

$A_t$  : Absorbance du test.

#### II.7.4. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique d'*Anacyclus clavatus* est mesuré par la réduction directe de  $\text{Fe}^{3+}(\text{CN}^-)_6$  en une forme ferreuse  $\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6$  qui est déterminée par la détection spectrophotométrique du complexe  $(\text{Fe}^{3+})_4[\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6]_3$  ayant une forte absorption à 700 nm (Le *et al.*, 2007). Différentes concentrations d'extraits ou de BHT sont mélangées avec 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de ferricyanide de potassium [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] à 1%. Après 20 minutes d'incubation à 50°C, 2,5 ml de TCA (10%) sont additionnés au milieu réactionnel, le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite, 2,5 ml de surnageant sont mélangés avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml de  $\text{FeCl}_3$  (0,1%) et l'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc sans  $\text{FeCl}_3$ . Les  $\text{EC}_{50}$  sont calculées à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

#### II.8. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SD et moyenne  $\pm$  SEM, pour les tests *in vivo*. Les  $\text{EC}_{50}$  et les  $\text{IC}_{50}$  sont calculées par la régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. La signification des différences entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test ANOVA univariée suivi du test de Dunnett/Tukey pour les comparaisons multiples. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

# RESULTATS ET DISCUSSION

# RESULTATS ET DISCUSSION

## RESULTATS

### I. Préparation des extraits d'*Anacyclus clavatus*

Les extraits aqueux et méthanolique obtenus ont l'aspect d'une poudre fine hygroscopique de couleur brune foncé. Le rendement de l'extraction méthanolique est de 19 %, tandis que celui de l'aqueuse est de 17 %.

### II. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins

La teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des extraits aqueux et méthanolique de l'*Anacyclus clavatus* ont été déterminées par méthodes au Folin-Ciocalteu, au trichlorure d'aluminium et celle de la précipitation de l'hémoglobine respectivement. Les résultats montrent que l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols et en tannins que l'extrait aqueux (**tableau 5**), par contre l'extrait aqueux est plus riche en flavonoïdes.

**Tableau 5.** Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tannins des extraits aqueux et méthanolique d'*Anacyclus clavatus*.

Extrait	Polyphénols µg d'équivalent d'acide gallique / mg d'extrait	Flavonoïdes µg d'équivalent de quercétine / mg d'extrait	Tannins µg d'équivalent d'acide tannique / mg d'extrait
Extrait aqueux	79,06 ± 3,24	16,39 ± 1,38	31,14 ± 2,27
Extrait méthanolique	131,30 ± 6,88	9,96 ± 0,43	39,21 ± 6,55

Les valeurs représentent la moyenne de 3 à 4 essais ± SD.

### III. Activité anti-inflammatoire des extraits d'*Anacyclus clavatus*

#### III.1. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris

L'effet anti-œdémateux de l'extrait méthanolique et aqueux d'*Anacyclus clavatus* a été évalué sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris qui est un modèle de l'inflammation aiguë.

Les souris du groupe témoin n'ayant reçu que la solution d'huile de croton ont développé au bout de 6 heures un œdème caractérisé par une augmentation de l'épaisseur de  $94 \pm 9,7 \mu\text{m}$

Le traitement par 2 mg/oreille de l'extrait méthanolique a induit chez les souris une atténuation très significative ( $p < 0,001$ ) de l'inflammation par rapport aux souris du groupe

témoin. L'augmentation de l'épaisseur au bout de 6 heures est de  $20 \pm 8,3 \mu\text{m}$ . L'inhibition est donc de 84%. Cette inhibition est supérieure à celle exercée par l'indométacine utilisée comme anti-inflammatoire de référence. En effet, l'augmentation de l'épaisseur de l'œdème 6 heures après traitement par 0.5 mg/oreille d'indométacine est de  $26 \pm 3,7 \mu\text{m}$ , ce qui correspond à une inhibition de 70% (**Figure 11A**). L'extrait aqueux donne le même résultat que l'extrait méthanolique (**Figure 11B**).

### III.2. Effet des extraits sur l'œdème de la patte induit par la carragénine

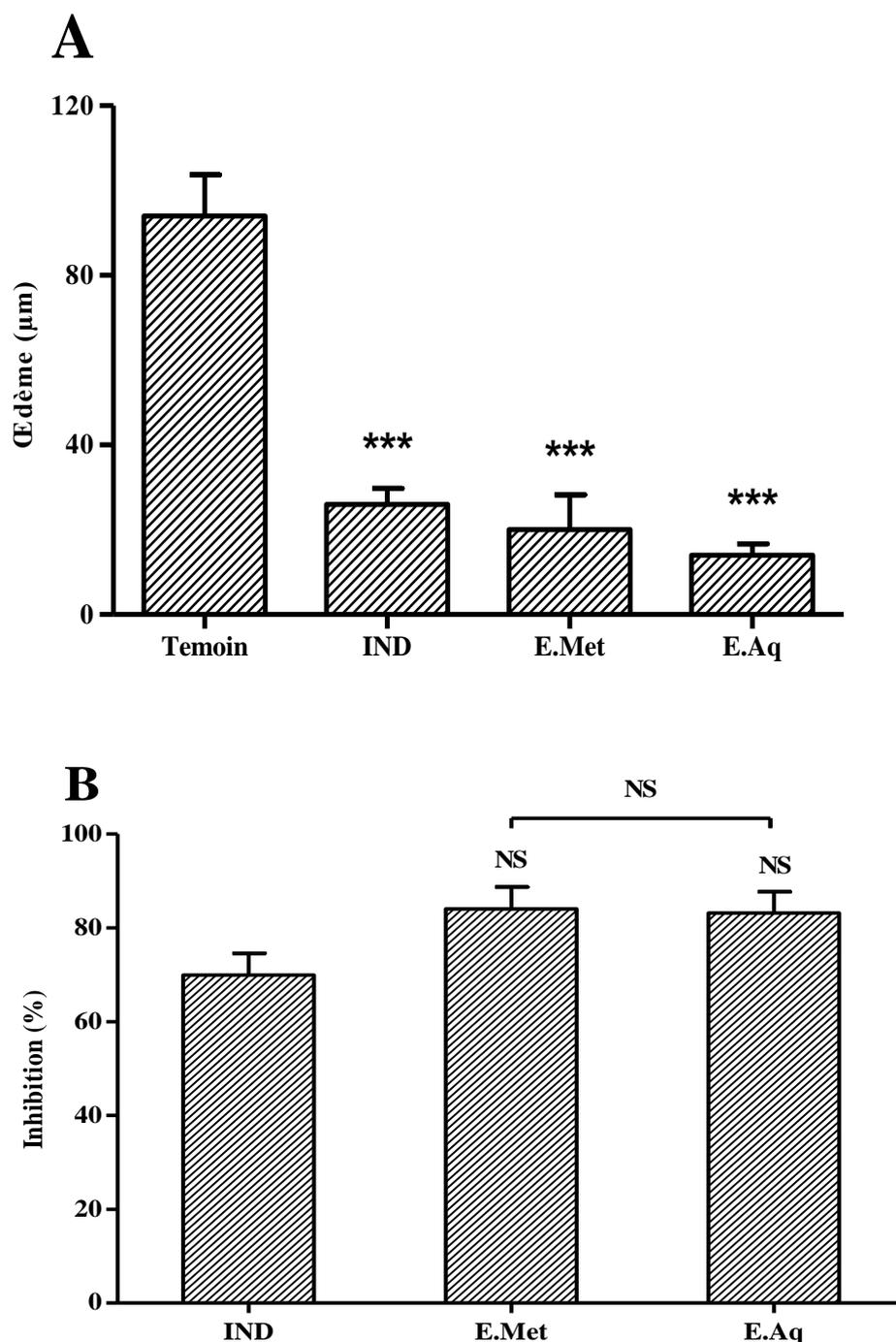
Dans le modèle de l'œdème aiguë de la patte du rat, l'injection sous-plantaire de la carragénine chez le groupe contrôle positif a provoqué un œdème dont le maximum du volume est environ 78 % de 4h à 6h après l'injection (**Figure 12A**).

Le prétraitement oral des rats par les 2 extraits d'*Anacyclus clavatus* ou l'aspirine prévient de façon significative la formation de l'œdème. En effet, chez les rats traités par 200 ou 400 mg/kg d'extrait méthanolique, les pourcentages d'augmentation de l'œdème 6h après l'injection de la carragénine sont 27 % et 19 % respectivement, ce qui correspond à des taux d'inhibition de 64 % et 74% respectivement. Ces inhibitions sont similaires à celle de l'aspirine. Avec les mêmes doses, l'extrait aqueux exerce un effet anti-œdémateux avec des taux d'inhibition de 80 % et 65 % respectivement. A 200 mg/kg, cette inhibition est meilleure que celle obtenue avec l'aspirine (**Figure 12B**).

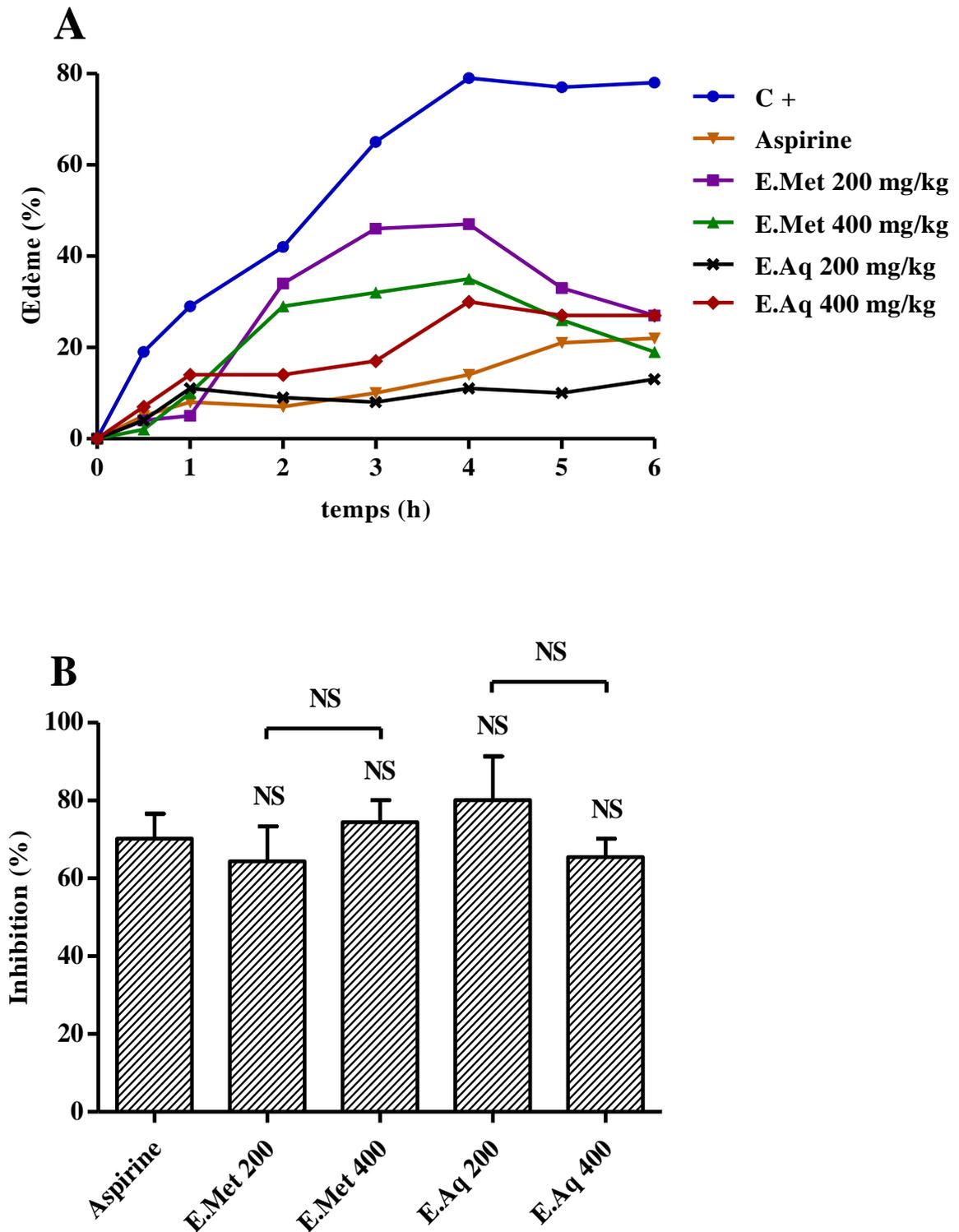
### III.3. Effet des extraits sur la pleurésie induite par la carragénine chez le rat

L'étude de l'effet des 2 extraits de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus* sur l'exsudation et le recrutement des neutrophiles vers le site enflammé a été réalisée en utilisant le modèle de la pleurésie induite chez le rat par injection intrapleurale de 0.2 ml de la carragénine 1%. Quatre heures après l'injection, le volume de l'exsudat pleural et le nombre de PMNs qu'il contient sont déterminés.

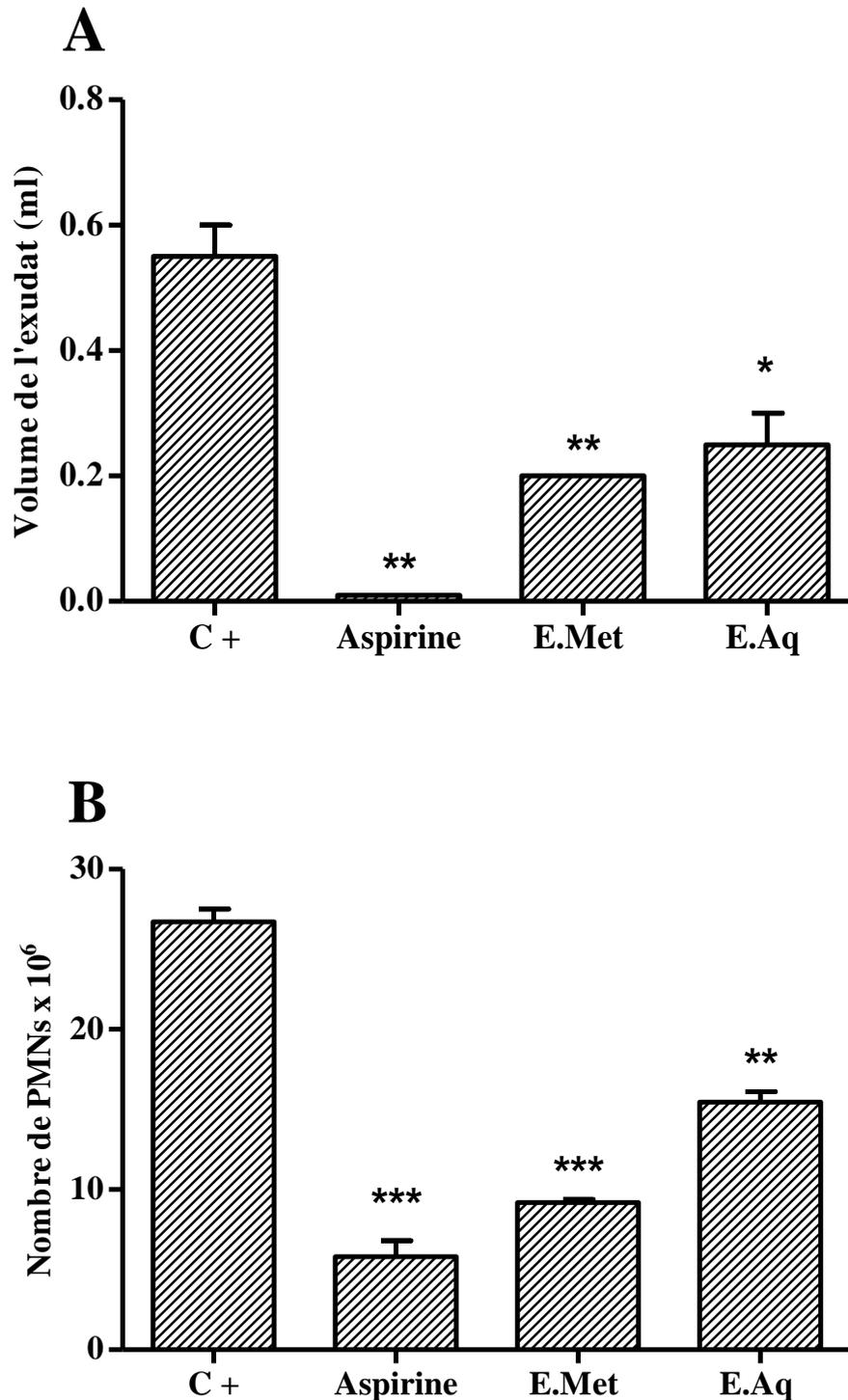
Les rats du groupe contrôle positif, n'ayant reçu par voie orale que du NaCl 0.9% une heure avant l'injection de la carragénine ont développé au bout de 4 heures une pleurésie aiguë, caractérisée par la formation d'un volume d'exsudat de  $0,55 \pm 0,07 \text{ ml}$  (**Figure 13A**) contenant  $26,70 \pm 1,13 \times 10^6$  de PMNs) (**Figure 13B**).



**Figure 11.** Effet des extraits de la partie aérienne de l'*Anacyclus clavatus* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. L'œdème est induit par application topique de 80 µg d'huile de croton sur la face interne de l'oreille droite. Les groupes de souris sont traités localement par 2 mg/oreille d'extrait aqueux (**E.Aq**) ou méthanolique (**E.Met**) ou par 0.5 mg/oreille d'indométacine (**IND**). Le groupe de souris témoin reçoit uniquement la solution d'huile de croton. **A** : Différence de l'épaisseur avant et 6 heures après l'induction de l'œdème. La comparaison est faite par rapport au groupe témoin. **B** : Pourcentage d'inhibition de l'œdème. La comparaison est faite par rapport à l'indométacine. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM (n =10). \*\*\* : p < 0.001, NS : non significatif (ANOVA univarié suivie du test de tukey).



**Figure 12.** Effet de l'extrait méthanolique (**E.Met**) et de l'extrait aqueux (**E.Aq**) de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus* sur l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat. L'œdème est induit par l'injection sous-plantaire de 0.1 ml la carragénine à 1% chez les rats prétraités oralement par NaCl 0.9 % (C<sup>+</sup>), l'aspirine (200 mg/kg), l'E.Met ou l'E.Aq (200 et 400 mg/kg) (**A**). Pourcentage d'inhibition de l'œdème 6 heures après l'injection de la carragénine (**B**). La comparaison est faite par rapport au groupe traité par l'aspirine. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM (n = 6-8). NS : non significatif (ANOVA univarié suivie du test de Tukey).



**Figure 13.** Effet des extraits d'*Anacyclus clavatus* et de l'aspirine sur l'exsudation (A) et le recrutement des PMNs (B). Les rats sont prétraités oralement soit avec 400 mg/kg d'E.Met, d'E.Aq ou 200mg/kg d'aspirine ou avec du NaCl 0.9% (contrôle positif, C<sup>+</sup>). La pleurésie a été induite par injection de 0,2 ml de la carragénine 1 %. Après 4 heures, le volume de l'exsudat et le nombre de PMNs sont déterminés. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SEM (n =5), \*\*\*: p<0,001, \*\*: p<0,01, \*: p<0,05 (ANOVA univarié suivie du test de Tukey).

Le prétraitement par 400 mg/kg d'extrait méthanolique a provoqué une diminution significative ( $p < 0,01$ ) du développement de la pleurésie. En effet, l'E.Met a induit une inhibition de l'exsudation de 64 % par rapport aux rats du groupe contrôle positif, et une diminution de 66 % dans le nombre de PMNs présents dans l'exsudat.

Un traitement avec 400 mg/kg d'extrait aqueux donne une inhibition significative ( $p < 0,05$ ) de l'exsudation de 55 % avec une diminution de 42 % dans le nombre de PMNs.

Les taux d'inhibition obtenus avec les 2 extraits sont loins d'atteindre ceux de l'aspirine même à 200 mg/kg. En effet, l'aspirine a exercé un puissant effet inhibiteur sur l'exsudation (98%) et a diminué le nombre de PMNs de 78 % (**Figure 13 et 14**).

#### IV. Activité antioxydante des extraits d'*Anacyclus clavatus*

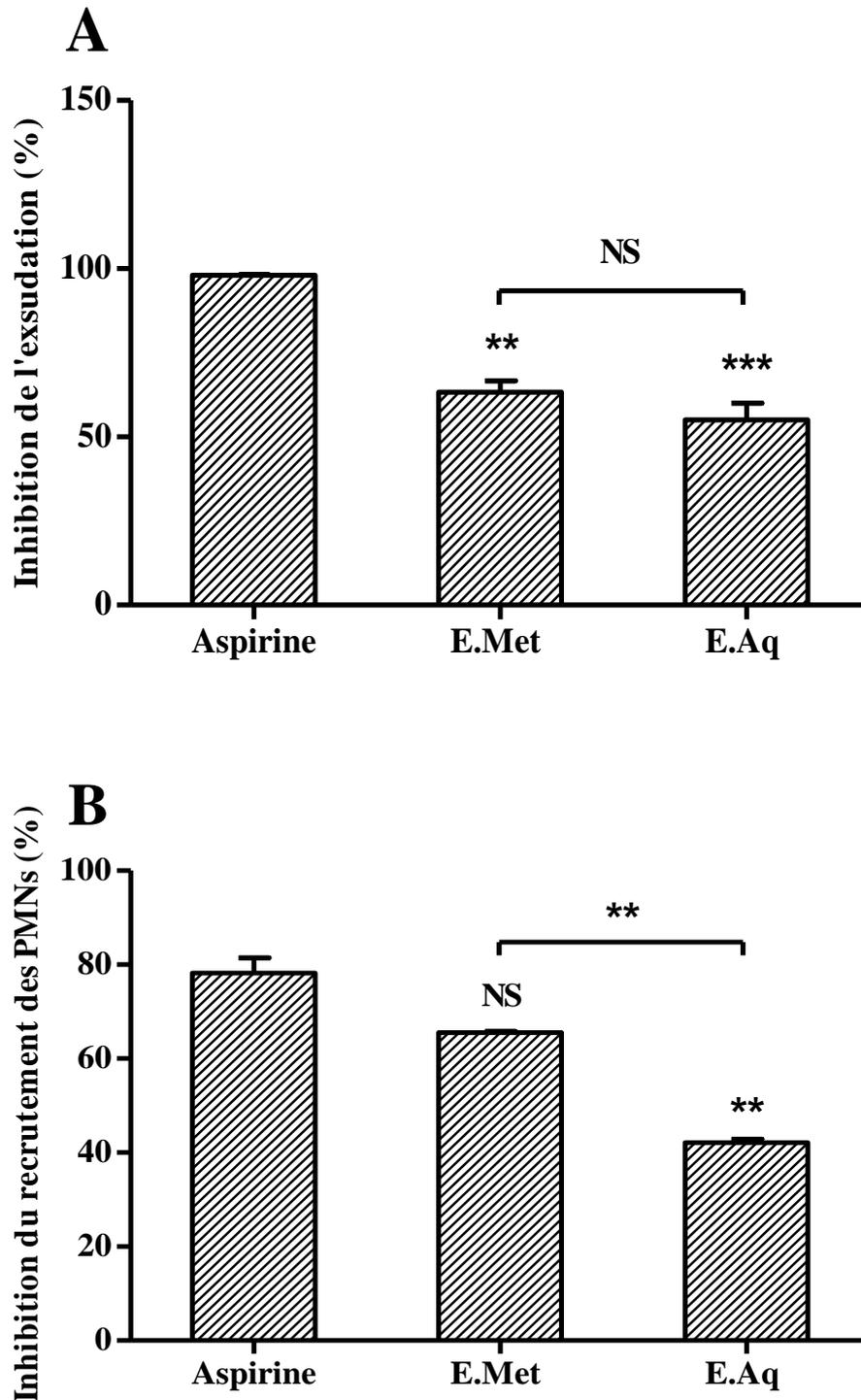
##### IV.1. Effet piègeur du radical DPPH

Les résultats obtenus montrent que les extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus* ont une activité antiradicalaire concentration dépendante (**Figure 15**).

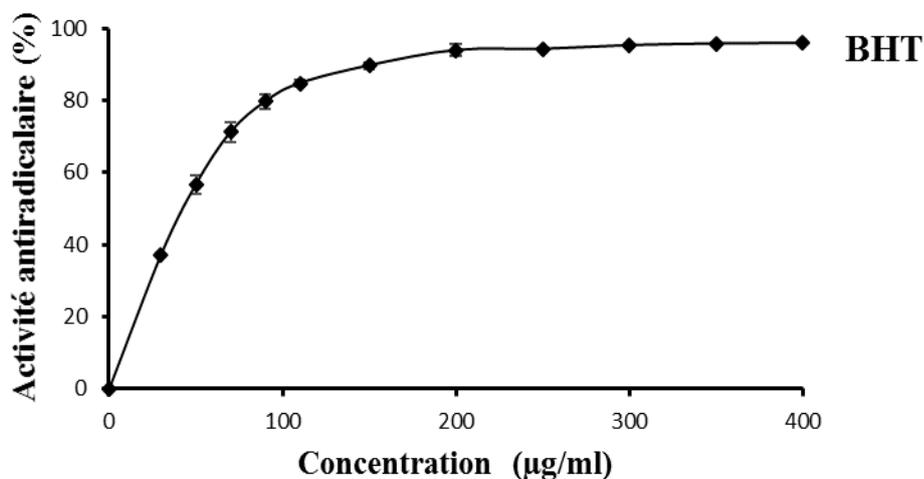
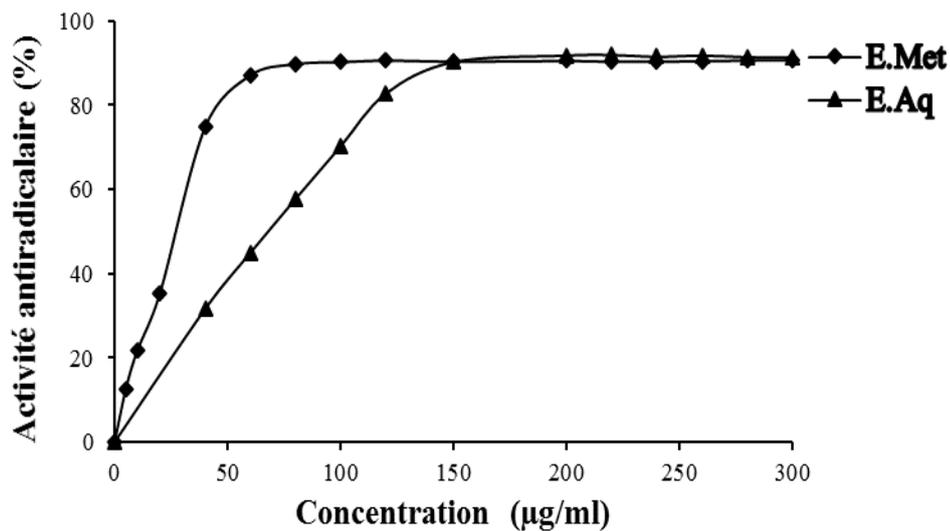
L'extrait méthanolique a exercé une activité maximale de 90 % à la concentration de 100 µg/ml. Cet effet est meilleur que celui de l'extrait aqueux qui à son tour est meilleur que celui du BHT, utilisé comme antioxydant standard. Le **tableau 6** montre les concentrations inhibitrices à 50% ( $IC_{50}$ ) de deux extraits et du BHT, ainsi que la concentration effective à 50% ( $EC_{50}$ ) et le pouvoir antiradicalaire (PAR).

**Tableau 6.** Valeurs des  $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$  et PAR des extraits d'*Anacyclus clavatus* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

Echantillon	$IC_{50}$ (µg/ml)	$EC_{50}$ (µg/µg DPPH)	PAR
Extrait aqueux	68,98 $\pm$ 1,64	0,88 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,03
Extrait méthanolique	28,30 $\pm$ 3,45	0,36 $\pm$ 0,04	2,78 $\pm$ 0,32
BHT	44,36 $\pm$ 3,10	0,57 $\pm$ 0,04	1,76 $\pm$ 0,12



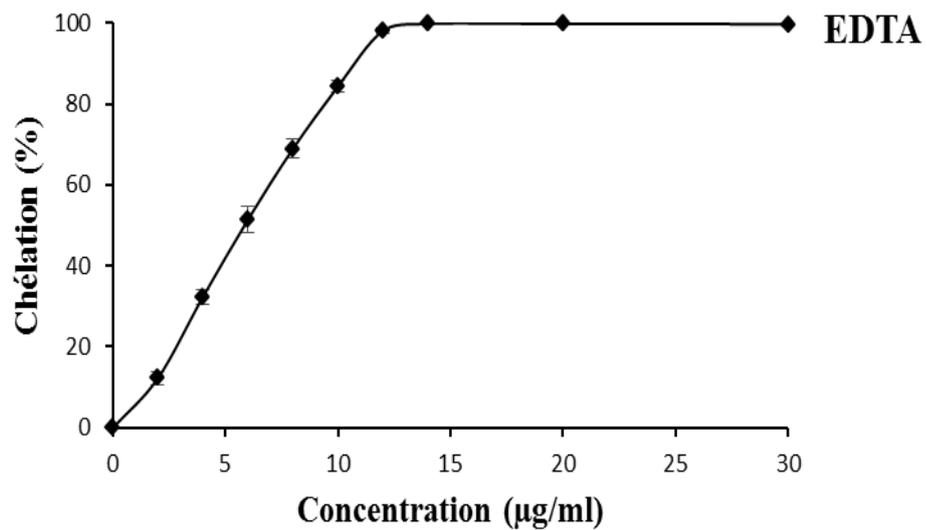
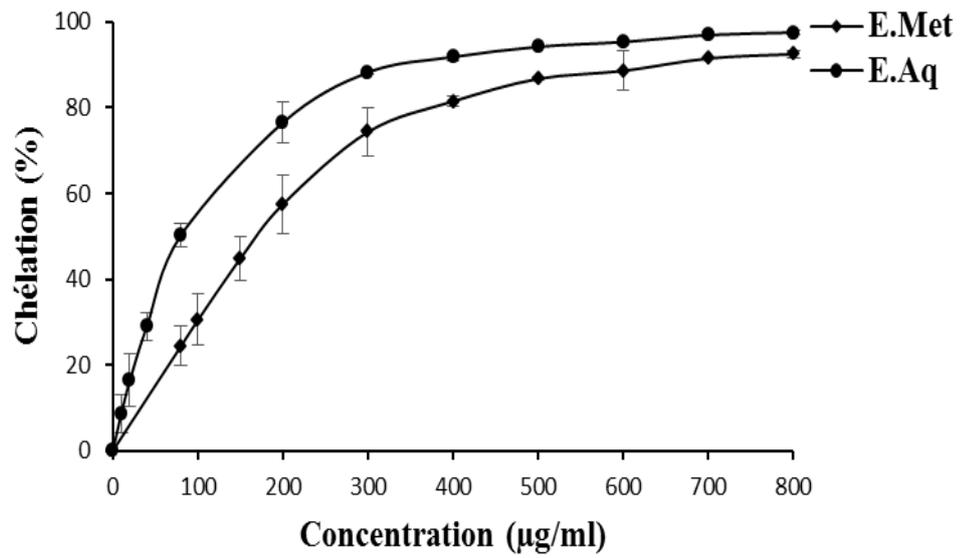
**Figure 14.** Pourcentages des inhibitions de l'exsudation (**A**) et du recrutement des PMNs (**B**) par les extraits d'*Anacyclus clavatus* et l'aspirine. Les rats sont prétraités oralement soit avec 400 mg/kg d'E.Met, d'E.Aq ou 200 mg/kg d'aspirine ou avec du NaCl 0.9% (contrôle positif, C<sup>+</sup>). La pleurésie a été induite par injection de 0,2 ml de la carragénine 1 % dans la cavité pleurale. Après 4 heures, le volume de l'exsudat et le nombre de PMNs présents dans la cavité pleurale de chaque rat sont déterminés. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SEM (n =5), \*\*\*: p<0,001, \*\*: p<0,01, \*: p<0,05 (ANOVA univarié suivie du test de Tukey).



**Figure 15.** Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique (**E.Met**) et de l'extrait aqueux (**E.Aq**) de la partie aérienne de l'*Anacyclus clavatus* et de l'antioxydant de référence (**BHT**) vis-à-vis du radical DPPH. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

#### IV.2. Effet chélateur du fer ferreux

La chélation du fer ferreux par l'extrait méthanolique et aqueux d'*Anacyclus clavatus* a été évaluée en utilisant la ferrosine comme détecteur du fer libre. Celle-ci se complexe avec le fer résiduel dans le milieu réactionnel et forme un chromophore rouge (Fe(II)-Ferrosine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Les absorbances mesurées montrent que les 2 extraits possèdent une activité chélatrice vis-à-vis de l'ion ferreux (**Figure 16**).



**Figure 16.** Activité chélatrice des extraits aqueux (**E.Aq**) et méthanolique (**E.Met**) de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus* et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux, exprimée en pourcentage de chélation. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

Les résultats montrent que l'extrait aqueux possède un effet chélateur meilleur que celui de l'extrait méthanolique. En effet, l'extrait aqueux exerce une chélation maximale de 88 % à une concentration de 300 µg/ml, tandis que l'E Met ne donne cet effet qu'à 600 µg/ml. Cependant, une chélation de 99 % est obtenue avec seulement 14 µg/ml d'EDTA, utilisé comme chélateur standard.

Les EC<sub>50</sub> obtenues avec les deux extraits et l'EDTA ainsi que leur activité chélatrice exprimée en mg d'équivalent EDTA/g d'extrait sont présentées dans le **tableau 7**.

**Tableau 7.** Valeurs des EC<sub>50</sub> et l'activité chélatrice en termes d'équivalents d'EDTA des extraits d'*Anacyclus clavatus*. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD.

Echantillon	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	Activité chélatrice (mg E-EDTA/g d'extrait)
Extrait aqueux	74,64 ± 11,68	81,11 ± 13,74
Extrait méthanolique	152,93 ± 1,67	38,89 ± 0,43
EDTA	5,97 ± 0,20	---

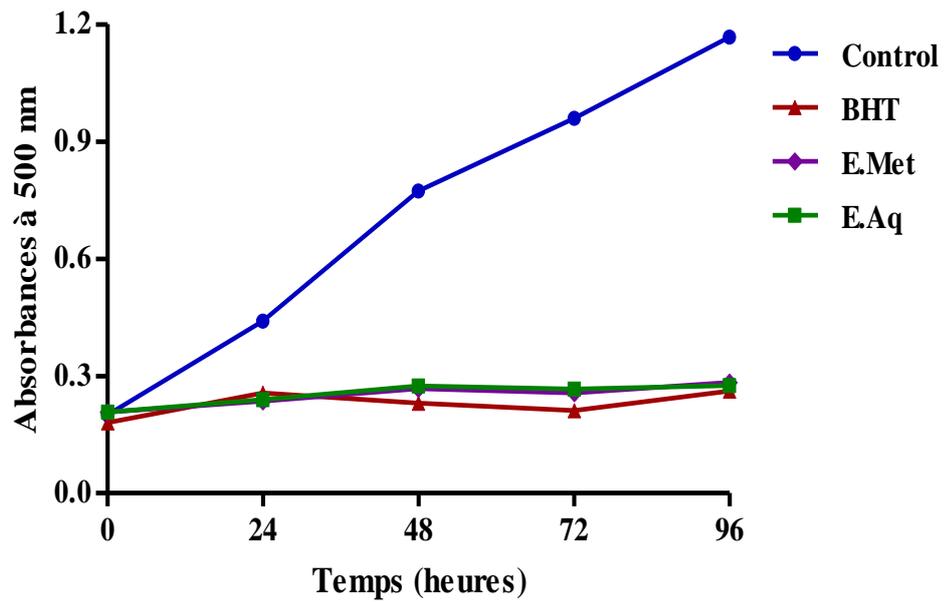
#### IV.3. Effet sur la peroxydation de l'acide linoléique

La **Figure 17** montre la cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits aqueux et méthanolique d'*Anacyclus clavatus* et du BHT. Les absorbances observées sont stables tout au long des 96 heures d'incubation, indiquant une forte activité antioxydante par rapport au contrôle négatif.

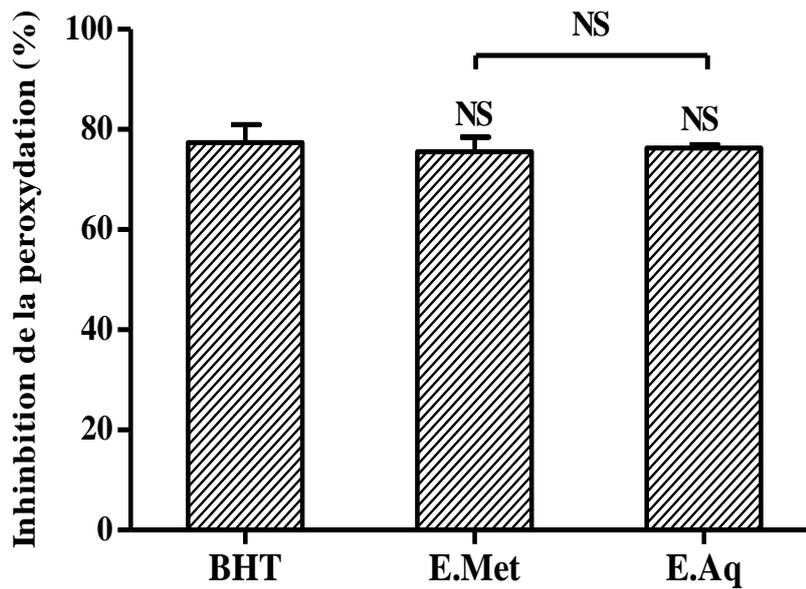
A une concentration de 50 µg/ml, les extraits aqueux et méthanolique exercent des effets inhibiteurs d'environ 75%. Ces valeurs sont statistiquement similaires à celle du BHT qui exerce un effet inhibiteur de 77 % à la même concentration (**Figure 18**).

#### IV.4. Pouvoir réducteur

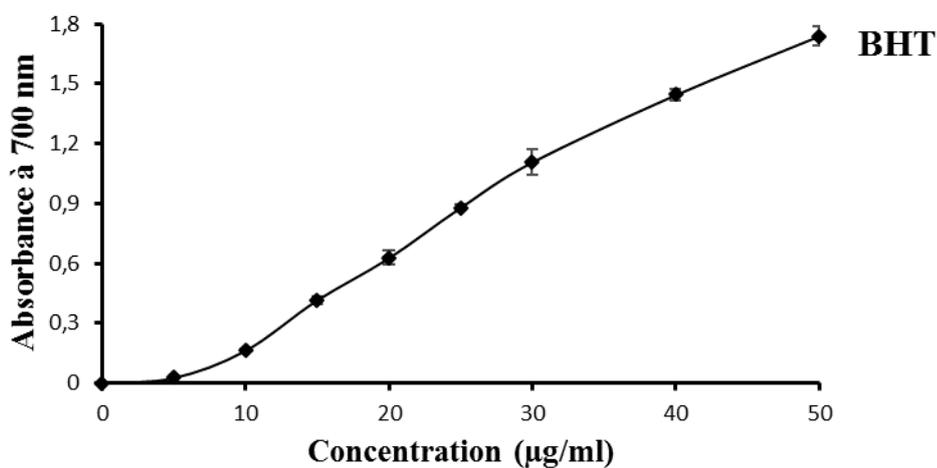
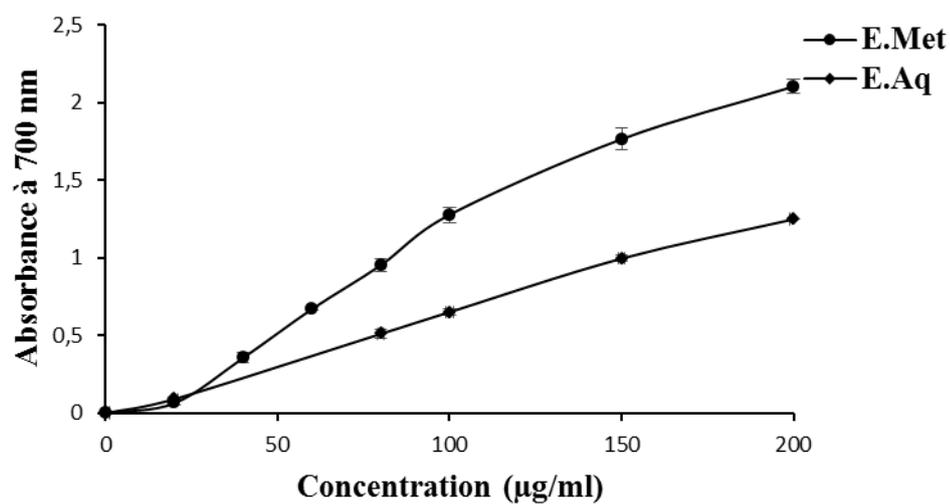
Les résultats montrent que les deux extraits d'*Anacyclus clavatus* possèdent un bon pouvoir réducteur (**Figure 19**). En effet, à la concentration de 150 µg/ml, l'extrait méthanolique a montré un pouvoir réducteur meilleur que celui de l'extrait aqueux. Le BHT montre un pouvoir réducteur maximal à 50 µg/ml. Les EC<sub>50</sub> sont représentés dans le **tableau 8**.



**Figure 17.** Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits aqueux et méthanolique de l'*Anacyclus clavatus* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.



**Figure 18.** Activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique des extraits aqueux (**E.Aq**) et méthanolique (**E.Met**) d'*Anacyclus clavatus* et du BHT au temps 96 h et à une concentration de 50  $\mu$ g/ml. Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures  $\pm$  SD; NS: non significatif.



**Figure 19.** Pouvoir réducteur des extraits aqueux et méthanolique d'*Anacyclus clavatus* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

**Tableau 8.** Les  $EC_{50}$  des extraits d'*Anacyclus clavatus* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

Echantillon	$EC_{50}$ (µg/ml)
Extrait aqueux	$84,77 \pm 4,31$
Extrait méthanolique	$49,97 \pm 2,21$
BHT	$17,00 \pm 0,29$

## DISCUSSION

L'utilisation des anti-inflammatoires à long terme est souvent associée à des effets indésirables tels que les ulcères gastro-intestinaux et l'insuffisance rénale (Corrado *et al.*, 2009). Les antioxydants de synthèses ont aussi plusieurs effets néfastes sur la santé, ils peuvent être impliqués dans les dommages hépatiques et la carcinogénèse (Gulcin *et al.*, 2005). Ce sont les raisons pour lesquelles, les scientifiques recherchent de nouveaux agents antioxydants et anti-inflammatoires d'origine végétale qui peuvent être des alternatifs aux substances synthétiques.

### I. Préparation et dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tannins

Le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une haute récupération de composés phénoliques (Bouزيد *et al.*, 2011) et l'obtention d'une meilleure activité antioxydante (Barros *et al.*, 2010).

L'extraction a été réalisée sur la poudre de la plante séchée à l'ombre. En fait, l'utilisation d'un matériel sec est recommandée car les flavonoïdes peuvent subir une dégradation enzymatique quand le matériel végétal est frais ou non séché (Marston et Hostettmann, 2006). Les fermentations microbiennes causées par l'humidité peuvent aussi être la cause de cette dégradation (Seidel, 2005). Le séchage à l'obscurité prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et la dégradation causées par les radiations UV de la lumière solaire (Jones et Kinghorn, 2005). L'utilisation de la poudre améliore l'extraction car la surface de contact entre l'échantillon et le solvant est plus grande, et la pénétration à l'intérieur des cellules non détruites après le broyage est plus facile.

Le rendement de l'extraction hydroalcoolique (19 %) est légèrement supérieur à celui de l'extraction aqueuse (17 %). Les solvants alcooliques étant plus capables d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires en facilitant l'extraction d'un plus grand nombre de molécules polaires, de moyenne et de faible polarité (Seidel, 2005). De plus, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction. Néanmoins, l'extraction aqueuse est faite par décoction à température élevée pendant 20 min. En fait, Su *et al.* (2006) ont rapporté que le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température. Cela est expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant la pénétration du solvant et la

solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2010). La chaleur peut, cependant, conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (Seidel, 2005), c'est la raison pour laquelle, la décoction a été effectuée pendant un temps réduit.

Le dosage des polyphénols par la méthode de Folin-Ciocalteu est la meilleure (Djeridane *et al.*, 2010) car elle est standardisée, simple, reproductible et les interférences avec la matrice de l'échantillon qui est souvent coloré sont minimisés à 765 nm (Huang *et al.*, 2005). Les flavonoïdes étant les composés les plus intéressants des polyphénols ont été déterminés dans ce travail par la méthode au trichlorure d'aluminium.

La teneur en tannins des extraits étudiés a été estimée par un test basé sur la précipitation de l'hémoglobine du sang hémolysé par les tannins entraînant une perte de coloration du surnageant proportionnelle à la teneur en tannins.

Les résultats obtenus montrent que les composés polyphénoliques sont abondants dans la partie aérienne de cette plante, cette abondance selon Djeridane *et al.* (2006) est une caractéristique de la famille des astéracées. Cela pourrait être lié aux conditions climatiques des endroits où elles poussent qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires comme les polyphénols (Falleh *et al.*, 2008).

L'extrait méthanolique obtenu est plus riche en polyphénols que l'extrait aqueux. En fait, la solubilité des polyphénols dépend du solvant utilisé, leur degré de polymérisation ainsi que de leur interaction avec les autres constituants et la formation de complexes insolubles. Le méthanol est le solvant le plus approprié pour une meilleure récupération de polyphénols (Falleh *et al.*, 2008). L'eau extrait particulièrement les flavonoïdes glycosylés et les tannins, tandis que les flavonoïdes aglycones sont extraits par les alcools ou les mélanges eau-alcool (Marston et Hostettmann, 2006). Cela explique en partie la richesse de l'extrait méthanolique de cette plante par rapport à l'extrait aqueux. Mais ceci ne peut pas être une règle, puisqu'il est possible que l'inverse soit trouvé dans le cas où un grand nombre de molécules solubles dans l'eau est non solubles dans l'alcool caractérise la plante étudiée (Ozen *et al.*, 2011).

Le taux de précipitation de l'hémoglobine par l'extrait méthanolique est plus important que celui de l'extrait aqueux ceci montre que l'extrait méthanolique contient plus de tannins de haut poids moléculaire que l'extrait aqueux. En fait, la capacité des tannins de former des complexes avec les protéines est gouvernée par leur poids moléculaire et fait intervenir des

liaisons hydrogène entre les atomes d'oxygène des groupements peptidiques et les groupements hydroxyles des polyphénols (McManus *et al.*, 1981; Hagerman et Butler, 1989).

## II. Activités anti-inflammatoires

L'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris a été utilisé comme un modèle de l'inflammation aiguë pour évaluer l'effet anti-inflammatoire du traitement local par l'extrait aqueux et méthanolique de *Anacyclus clavatus*. Ce modèle expérimental est très utilisé pour le criblage d'anti-inflammatoires à effet local (Altinier *et al.*, 2007).

L'effet phlogogénique de l'huile de croton est dû au principe actif 4 $\beta$ -12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) qu'elle contient. Le TPA induit une réponse inflammatoire caractérisée par une production importante de médiateurs pro-inflammatoires, une augmentation de la perméabilité vasculaire, une infiltration de neutrophiles et un œdème (Garg *et al.*, 2008). L'épaisseur de l'œdème atteint son maximum 6 heures après l'application de l'huile de croton (Tubaro *et al.*, 1985). Selon Murakawa et Yamaoka (2006), le TPA induit l'inflammation en mettant en jeu l'activation de la protéine kinase C, la phospholipase A2, la cyclooxygénase et la lipoxygénase avec l'induction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Aquila *et al.* (2009) suggèrent aussi que le TPA stimule l'expression de la cyclooxygénase 2 et de la NO synthase inductible via l'activation de la PKC.

Les extraits aqueux et méthanolique ont exercé une inhibition significative du développement de l'œdème. Cette inhibition est statistiquement similaire à celle exercée par l'indométacine, utilisée comme anti-inflammatoire standard qui inhibe les cyclooxygénases 1 et 2, et la formation de l'exsudat et la production de TNF  $\alpha$ , IL-6 et PGE2 (Bidaut-Russel, 2008). L'effet anti-inflammatoire obtenu peut être également expliqué par l'inhibition de la PKC dont l'implication dans le processus inflammatoire est bien évidente dans ce modèle expérimental (Delaporte *et al.*, 2004).

Ces résultats sont en concordance avec ceux de Rimbau *et al.* (1999). L'effet anti-inflammatoire de ces 2 extraits d'*Anacyclus clavatus* est probablement dû à la présence de substances lipophiles capables de traverser la barrière cutanée et douées d'activités anti-inflammatoires (Manga *et al.*, 2004).

Selon Kim *et al.* (1993), l'effet anti-inflammatoire observé n'est pas dû à l'inhibition directe de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase car l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces deux enzymes ne réduit pas l'œdème dans ce modèle expérimental de l'inflammation. Cet effet serait dû à la présence de composés doués d'activité antioxydante comme l'ont

suggéré Conforti *et al.* (2008). En effet, les ROS produits au cours de l'inflammation par les cellules phagocytaires, et durant le métabolisme de l'acide arachidonique peuvent activer la phospholipase A2 qui a pour rôle de libérer ce dernier à partir des phospholipides membranaires pour qu'il soit transformé par la suite en médiateurs pro-inflammatoires comme les leucotriènes et les prostaglandines (Geronikaki et Gavalas, 2006). Cette possibilité est soutenue par les résultats de Selles *et al.* (2012) qui ont rapporté que l'extraits aqueux et méthanolique de l'*Anacyclus pyrethrum* ont un contenu relativement élevé en flavonoïdes et une activité antioxydante remarquable. Les effets antioxydants observés dans la présente étude supportent également cette possibilité.

L'inflammation aiguë induite chez le rat par l'injection de la carragénine est un modèle animal largement utilisé pour évaluer les propriétés anti-inflammatoires de différents agents (Cuzzocrea *et al.*, 1998 ; Jilroy *et al.*, 1999). L'injection de la carragénine provoque la libération de plusieurs médiateurs chimiques responsables du processus inflammatoire. Cette réponse inflammatoire est biphasique avec une phase initiale d'une heure qui est due à la libération de l'histamine et de la sérotonine. La bradykinine est libérée au cours de la seconde phase et la biosynthèse des prostaglandines intervient au-delà de la troisième heure (Wantana *et al.*, 2009).

Le prétraitement oral des rats par les extraits de l'*Anacyclus clavatus* inhibent de façon significative l'œdème aigu de la patte des rats dès la première heure de l'induction de l'inflammation et durant toutes les phases. Cette inhibition est similaire ou meilleur (dans le cas de 200 mg/kg de l'extrait aqueux) que celle obtenue avec l'aspirine, utilisée comme anti-inflammatoire de référence qui s'oppose à l'effet de l'histamine, de la sérotonine, des kinines et des prostaglandines (Sanogo *et al.*, 2006). Ainsi, ces extraits pourraient avoir une action antagoniste à l'effet de médiateurs pro-inflammatoires. La forte inhibition de l'œdème a été observée à la sixième heure pour les 2 extraits. Cela suggère que l'action inhibitrice des extraits s'exercerait d'avantage sur les médiateurs de la deuxième phase de l'inflammation aiguë, notamment les cyclo-oxygénases qui sont responsables de la synthèse des prostaglandines (Ouédraogo *et al.*, 2012). Cette activité anti-inflammatoire des 2 extraits serait probablement due à la présence des polyphénols, des flavonoïdes et des tannins (Amezouar *et al.*, 2013).

L'exsudation et l'infiltration des neutrophiles vers la cavité pleurale des rats durant les 4 premières heures qui suivent l'injection de la carragénine ont été exploitées dans la présente étude pour évaluer l'effet anti-inflammatoire *in vivo* des 2 extraits étudiés. L'administration

orale de ces extraits aux rats, réduit significativement le développement de la pleurésie. En effet, le volume de l'exsudat et le nombre de neutrophiles ayant migrés vers la cavité pleurale de ces rats sont significativement réduits. Ces extraits exerceraient leur effet anti-pleurétique par la réduction de la production des médiateurs inflammatoires impliqués dans le déroulement des différentes étapes de la réaction inflammatoire aiguë induite par la carragénine, ainsi que par l'inhibition du recrutement des leucocytes vers la cavité pleurale en exerçant des effets anti-chimioattractants. Nos extraits étant riches en polyphénols et en flavonoïdes qui inhibent l'exsudation et la migration des leucocytes en bloquant leur adhésion à la paroi vasculaire (Manthey, 2000; Middleton *et al.*, 2000). Cet effet pourrait être dû à l'inhibition de la synthèse de l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , principaux inducteurs de l'expression des molécules adhésives sur la paroi vasculaire (Cho *et al.*, 2000). Aussi, le traitement par le flavonoïde luteolin 7-glucoside réduit l'augmentation des concentrations de certains médiateurs inflammatoires comme NO, TNF- $\alpha$  et IL-6 (Lafuente *et al.*, 2009). L'acide gallique à son tour inhibe la migration des leucocytes en inhibant les molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et E-selectin dans les cellules endothéliales vasculaires, cette inhibition est due à l'inhibition de l'IL-1, TNF- $\alpha$ , et le NF- $\kappa$ B (Takatoshi *et al.*, 1999).

### **III. Activités antioxydantes**

Afin d'évaluer le potentiel antioxydant des extraits, il est important de combiner plusieurs tests antioxydants. En effet, l'activité antioxydante peut être attribuée à différents mécanismes tels que le piégeage des radicaux libres, la chélation des ions métalliques, la prévention de l'initiation d'une chaîne de réactions productrice des ROS et la décomposition des peroxydes (Ozen, 2009).

#### **III.1. Activité anti-radicalaire**

Les résultats de la présente étude montrent que les extraits aqueux et méthanolique d'*Anacyclus clavatus* possèdent des effets piègeurs remarquables vis-à-vis du radical DPPH. En effet, les valeurs des IC<sub>50</sub> obtenues avec ces extraits sont faibles de l'ordre de 69 et 29  $\mu$ g/ml respectivement. L'extrait méthanolique est plus actif que le BHT, utilisé comme antioxydant de référence, par contre l'extrait aqueux est moins actif. L'activité des deux extraits est probablement due à la présence de composés phénoliques qui sont connus comme des substances ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Hennebelle *et al.*, 2004). L'action de ces antioxydants est supposée être due à leur capacité de donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons dérivée principalement de l'hydroxyle du cycle A des flavonoïdes (Le *et al.*, 2007).

Puisque l'extrait méthanolique est plus riche en polyphénols que l'extrait aqueux, sa capacité de piéger le radical DPPH est plus élevée. Kintzios *et al.* (2010) ont trouvé que les extraits méthanoliques de certaines plantes médicinales ont des effets piègeurs de radicaux DPPH plus grands que ceux de leurs extraits aqueux. Cela montre qu'il y a une corrélation entre le contenu en polyphénols et l'activité antioxydante et pourrait indiquer que les polyphénols sont responsables de cette activité. Cette corrélation a été rapportée par d'autres auteurs. Selles *et al.* (2012) ont montré qu'il existe une corrélation très significative entre la teneur en polyphénols et l'activité scavenger du radical DPPH.

### III.2. Activité chélatrice

Les ions  $Fe^{2+}$  sont les pro-oxydants qui catalysent la décomposition des hydroperoxydes en radicaux alkoxy et peroxy, amplifiant la peroxydation des lipides (Pincemail *et al.*, 1999). Ils peuvent aussi générer des radicaux  $OH^{\bullet}$  via les réactions de Fenton. Ainsi, les chélateurs des ions ferreux peuvent fournir une protection contre le dommage oxydatif. La chélation du fer ferreux par les extraits aqueux et méthanolique d'*Anacyclus clavatus* a été évaluée dans cette étude par la méthode à la ferrosine, qui forme un complexe avec les ions  $Fe^{2+}$  libres. De plus, la diminution de l'absorbance du complexe  $Fe^{2+}$ -ferrosine indique la présence de chélateurs qui est rentré en compétition avec la ferrosine.

Les profils de l'activité chélatrice des 2 extraits d'*Anacyclus clavatus* montrent une cinétique non linéaire et concentration dépendante. Cela pourrait être dû à la nature complexe des extraits contenant un nombre de différents chélateurs de fer, avec différentes affinités, en compétition avec la ferrosine.

Les valeurs des  $EC_{50}$  obtenues (0.075 mg/ml et 0.17 mg/ml) avec l'extrait aqueux et l'extrait méthanolique respectivement indiquent que les 2 extraits possèdent de très fortes activités chélatrices. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus avec d'autres plantes montre l'importance de la capacité des extraits étudiés. En effet, Ksouri *et al.* (2009) ont trouvé que les extraits de *Tamarix gallica* ont d'excellents effets antioxydants bien qu'ils exhibent des effets chélateurs faibles avec des valeurs d' $EC_{50}$  de 8,3 mg/ml et 6 mg/ml. Par ailleurs, Chan *et al.* (2007) ont montré que l'infusion du thé vert, connu par son potentiel antioxydant, a donné une activité chélatrice d'environ 42% à une concentration de 3,3 mg/ml. L'étude d'Alfartosy (2011) a montré que l'extrait méthanolique d'*Inula graveolens* a donné une activité chélatrice d'environ 70% à une concentration de 2 mg/ml. Tandis que des effets chélateurs maximaux de 88% et 89% sont produits par les extraits aqueux et méthanolique

d'*Anacyclus clavatus* à des concentrations de seulement 0,3 mg/ml et 0,6 mg/ml respectivement.

L'activité chélatrice élevée de l'extrait aqueux par rapport à l'extrait méthanolique peut être expliquée par l'hydrosolubilité des agents chélateurs. Les résultats de Sahreen *et al.* (2010) montrent que les extraits des plantes induisent des effets chélateurs directement proportionnels à la polarité de leurs solvants. En effet, les mucilages qui sont des polysaccharides solubles dans l'eau mais pas dans l'alcool sont des chélateurs de métaux (Watanabe, 2008). Les groupements hydrosolubles possèdent un caractère nucléophile élevé qui leur confère la capacité chélatrice (Ozen *et al.*, 2011).

L'activité de chélation des ions métalliques est aussi attribuée à la présence de certains flavonoïdes et les acides phénoliques (Le *et al.*, 2007 ; Capecka *et al.*, 2005). Les effets antioxydants des flavonoles (quercétine, myricétine et morine) sont dus en partie à leurs capacités de fixer le  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Zn^{2+}$  à plusieurs sites (Verdan *et al.*, 2011). La quercétine et la myricétine forment des complexes avec le  $Fe^{2+}$  via les groupes hydroxyles du cycle B ainsi que les groupes 3-hydroxy-4-céto et 5-hydroxy-4-céto des cycles A et C (Van Acker *et al.*, 1996). Cependant, le kaempférol a la capacité de fixer le  $Cu^{2+}$  et le  $Fe^{2+}$  via les groupements fonctionnels carbonylés. Les composés ayant des structures contenant deux ou plusieurs de ces groupements :  $-OH$ ,  $-SH$ ,  $-COOH$ ,  $-PO_3H_2$ ,  $C=O$ ,  $-NR_2$ ,  $-S-$  et  $-O-$  dans leur structure peuvent montrer une activité chélatrice des métaux (Ak et Gulcin, 2008).

### **III.3. Activité inhibitrice de la peroxydation lipidique**

L'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour l'industrie alimentaire car elle entraîne des altérations qualitatives et nutritionnelles. Elle est à l'origine des mauvais goûts, odeurs et produits toxiques (peroxydes, aldéhydes) qui touchent aussi bien aux valeurs nutritionnelles des aliments qu'à la santé des consommateurs (Gulcin *et al.*, 2010). L'oxydation lipidique peut aussi avoir lieu *in vivo* où elle se trouve associée à plusieurs pathologies à savoir les maladies cardiovasculaires, le vieillissement et le cancer (Ramarathnam *et al.*, 1995). Ainsi, il est très important de chercher des inhibiteurs de la peroxydation lipidique aussi bien dans les denrées alimentaires que dans l'organisme (Bougatef *et al.*, 2009).

L'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique des deux extraits est déterminé par la méthode de thiocyanate ferrique en présence de l'acide linoléique. La peroxydation lipidique *in vivo* est une altération oxydative des acides gras polyinsaturés dans les membranes

cellulaires catalysée par les radicaux libres (Bougatef *et al.*, 2009). Ainsi, l'acide linoléique pourrait servir comme modèle d'acides gras trouvés dans les membranes.

Durant la peroxydation lipidique, les antioxydants agissent de différentes façons à savoir le balayage des radicaux libres, la décomposition des peroxydes et la chélation des ions métalliques. Souvent, plus d'un seul mécanisme est impliqué pour avoir un effet en synergie (Moure *et al.*, 2001).

Les résultats obtenus montrent que les effets des extraits étudiés sont très proches de ceux du BHT qui a été choisi comme référence, du fait qu'il est le plus souvent utilisé dans la conservation des produits alimentaires.

Ces résultats indiquent clairement que les deux extraits possèdent un excellent effet contre la peroxydation lipidique. Cette capacité de modifier la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres est liée non seulement aux caractéristiques structurales des agents antioxydants mais aussi à leur capacité d'interagir avec et pénétrer dans les bicouches lipidiques (Antonella *et al.*, 1995). Il a été montré que la structure et la lipophilie des polyphénols sont des facteurs déterminants des propriétés antioxydantes de ces composés dans la couche lipidique de la membrane (Djeridane *et al.*, 2010).

Le puissant effet antioxydant des extraits d'*Anacyclus clavatus* dans ce test peut être aussi dû à leurs capacités chélatrices. Il est possible que lors de l'ajout de la solution de  $\text{FeCl}_2$  (source des ions  $\text{Fe}^{2+}$ ) dans ce test, les extraits ont chélatés les ions ferreux avant qu'ils interagissent avec les peroxydes formés par peroxydation de l'acide linoléique pour former les ions ferriques.

#### **III.4. Activité réductrice**

La capacité de donation d'électrons dans une réaction d'oxydoréduction peut être aussi utilisée dans l'évaluation de l'activité antioxydante d'un composé. Cette capacité de donation d'électrons est appelée pouvoir réducteur.

La présence de réducteurs dans les extraits, réduit le  $\text{Fe}^{3+}$ /complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en suivant l'augmentation de l'intensité de la couleur à 700 nm (Chang *et al.*, 2008). Cette intensité est fonction du pouvoir réducteur de l'échantillon étudié (Yadav *et al.*, 2012).

Les valeurs des  $\text{EC}_{50}$  du pouvoir réducteur montrent que ces 2 extraits possèdent de très fortes capacités réductrices bien qu'elles sont inférieures à celle du BHT. Cela démontre leur propriété de donation d'électrons et par conséquent leur capacité de neutraliser les radicaux

libres. Cette capacité pourrait être due à la présence de flavonoïdes qui sont des principaux donneurs d'électrons (Le *et al.*, 2007).

D'autre part, l'effet réducteur des extraits d'*Anacyclus clavatus* ainsi que leur teneur en polyphénols sont significativement identiques. Cela pourrait indiquer qu'il existe de corrélation entre leur contenu en polyphénols et leurs activités réductrices. En fait, Selles *et al.* (2012) ont trouvé que l'extrait méthanolique de l'*Anacyclus pyrethrum* était le plus actif dans le test du pouvoir réducteur que tous les autres extraits testés dans leur étude à savoir les extraits aqueux et chloroformique. De plus, Ozen *et al.* (2009) ont trouvé que l'extrait méthanolique de *Thymus praecox* était le plus actif que les autres extraits aqueux, éthanolique, acétonique et hexanique. En revanche, Ksouri *et al.* (2009) ont trouvé qu'il y a une forte corrélation entre le contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits méthanoliques des fleurs et des feuilles de *Tamarix gallica* et leurs activités antioxydantes. Ces auteurs réfèrent l'activité antioxydante des extraits de cette plante à la présence d'acides phénoliques et des flavonoïdes. Cependant, ils ont trouvé que cette corrélation ne s'applique pas au contenu en tannins.

Le pouvoir réducteur de l'espèce *Anacyclus clavatus* est probablement dû à la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique et aqueux d'*Anacyclus clavatus* appliqués localement sur l'oreille de la souris possèdent un effet anti-inflammatoire remarquable. De même ces extraits possèdent une activité anti-inflammatoire importante lorsqu'ils sont administrés par voie orale et inhibent le développement de l'œdème de la patte induit par la carragénine chez le rat. En plus, l'inhibition de l'exsudation et du recrutement des neutrophiles vers la cavité pleurale des rats, rendus pleurétiques par la carragénine, a permis d'attribuer à ces extraits des propriétés anti-exsudatives et anti-chimioattractantes.

Ces 2 extraits possèdent aussi une importante activité antioxydante *in vitro*. Les extraits étudiés ont exercé une forte inhibition du radical DPPH, une forte activité chélatrice vis-à-vis du fer ferreux, un excellent effet inhibiteur de la peroxydation lipidique et un puissant pouvoir réducteur.

Les résultats de cette étude touchant l'aspect anti-inflammatoire et antioxydant des extraits aqueux et méthanolique de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus* sont d'un grand intérêt, mais des études complémentaires approfondies sont nécessaires pour comprendre leurs mécanismes moléculaires et cellulaires. Ces études doivent être focalisées sur l'isolement des composés bioactifs des extraits puis l'évaluation des effets de ces composés sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'inflammation et sur les voies de signalisations, les enzymes impliquées dans la production des ROS et sur les systèmes antioxydants.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abreu IA and Cabelli D E (2010). Superoxide dismutases a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochim Biophys Acta*, **1804**, 263-274.
- Ak T and Gulcin I (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact*, **174**, 27-37.
- Albano SM and Miguel MG (2010). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Ind Crops Prod*, **33**, 338-343.
- Alfartosy AM (2011). Antioxidant properties of methanolic extract from *Inula graveolens* L. *Turk J Agric For*, **35**, 591-596.
- Aliboudhar H, Tigrine-Kordjani N, Hanifi N and Meklati BY (2013). Volatiles profiling and antioxidant activity evaluation of different parts of a medicinal plant: *Anacyclus Clavatus*. *J Herbs Spices Med Plants*, **19**, 33-47.
- Altinier G, Sosa S, Aquino RP, Mencherini T, Della Loggia R and Tubaro A (2007). Characterization of Topical Antiinflammatory Compounds in *Rosmarinus officinalis* L., *J Agric Food Chem*, **55**, 1718-1723.
- Amezouar F, Badri W, Hsaine M, Bourhim N and Fougrach H (2013). Evaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire d'*Erica arborea* L. du Maroc. *Pathol Biol*, **61**, 254-258.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD and Zychlinsky A (2012). Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Immunol.* **30**,459-89.
- Antonella S, Mario S, Maria L, Daniela M, Francesco B and Francesco C (1995). Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembrane. *Free Radic Biol Med*, **19**, 481-486.
- Aquila S, Giner RM, Recio MC, Spegazzini ED and Rios JL (2009). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. *J Ethnopharmacol*, **121**, 333-337.
- Ashley NT, Weil ZM and Nelson JR (2012). Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Ecol Evol Syst*, **43**, 385-406.
- Baggioni M (1988). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, **392**, 565-588.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M and Gazin M (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzne forsch*, **46**, 1086-1089.
- Balaban RS, Nemoto S and Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **120**, 483-495.
- Barnes JB and Adcock IM (2009). Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*, **373**, 1905-1917.

- Barros L, Heleno SA, Carvalho AM and Ferreira ICFR (2010). *Lamiaceae* often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT*, **43**, 544-550.
- Basli A, Chibane M, Madani K and Oukil N (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, **10**, 2-9.
- Bedard K and Krause KH (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, **87**, 245-313.
- Benitez G, Gonzalez-Tejero MR and Molero-Mesa J (2010). Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *J Ethnopharma*. **129**, 87-105.
- Bianchi A, Becuwe P, Franck P and Dauca M (2002). Induction of MnSOD gene by arachidonic acid is mediated by reactive oxygen species and p38 MAPK signaling pathway in human HepG2 hepatoma cells. *Free Radic Biol Med*, **32**, 1132-1142.
- Bidaut-Russell M (2001). Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, **15**, 739-753.
- Birklein F and Schmelz M (2008). Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett*, **437**, 199-202.
- Black RA, Rauch CT and Kozlosky CJ (1997). A metalloprotease disintegrin that releases tumour-necrosis factor alpha from cells. *Nature*, **385**, 729-733.
- Blain H, Jouzeau JY, Netter P, Jeandel C (2000). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2. Intérêt et perspectives. *Rev Méd Interne*, **21**, 978-88.
- Blokhina O, Virolainen E and Fagerstedt KV (2003). Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*. *Annals Botany*, **91**, 179-194.
- Bonizzi G, Piette J, Merville MP and Bours V (2000). Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor kappa B activation by interleukin-1. *Biochem Pharmacol*, **59**, 7-11.
- Bonnefont-Rousselot D (2002). Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. **5**, 561-568.
- Börzsei R, Pozsgai G, Bagoly T, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J and Helyes Z (2008). Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience*, **152**, 82-88.
- Botting R M and Botting J H (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clin Drug Investig*, **19**, 1-7.
- Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y and Nasri M (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem*, **114**, 1198-1205.

- Bouزيد W, Yahia M, Abdeddaim M, Aberkane MC and Ayachi A (2011). Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de *L'Aubepine Monogyne*. *Leb Sci J*, **12**, 59-69.
- Brigelius-Flohe R and Kipp A (2009). Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1790**, 1555-1568.
- Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat J L and Sauvaigo S (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem*, **383**, p 93.
- Capecka E, Mareczek A and Leja M (2005). Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some lamiaceae species. *Food Chem*, **93**, 223-226.
- Chan EWC, Lim YY and Chew YL (2007). Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chem*, **102**, 1214-1222.
- Chang HT, Cheng YG, Wu CL, Chang ST, Chang TT and Su Y (2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant phytopathogenic fungi. *Bioresour Technol*. **99**, 6266-6270.
- Cho KJ, Yun CH, Yoon DY, Cho YS, Rimbach G, Packer L and Chung AS (2000). Effect of bioflavonoids extracts from the bark of *Pinus maritime* on proinflammatory cytokine, interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicol Appl Pharmacol*, **168**, 64-71.
- Colman RW (1999). Biologic activities of the contact factors in vivo. Potentiation of hypertension, inflammation, and fibrinolysis and inhibition of cell adhesion, angiogenesis and thrombosis. *Thromb Haemost*, **82**, 1568-1577.
- Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D, Tubaro, A Menichini F and Della Loggia R (2008). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *J Ethnopharmacol*, **116**, 144-151.
- Corrado B, Marco T, Rocchina C, Matteo F, Luca A, Narcisa G and Mario DT (2009). Role of coxibs in the strategies for gastrointestinal protection in patients requiring chronic non-steroidal anti-inflammatory therapy. *Pharm Res*, **59**, 90-100.
- Cuzzocrea S, Wayman NS, Mazzon E, Dugo L, Di Paola R, Serraino I, Britti D, Chatterjee P K, Caputi AP and Thiernemann C (2002). The cyclopentenone prostaglandine 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 attenuates the development of acute and chronic inflammation. *Mol Pharmacol*, **61**, 997-1007.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman AL and Szabo C (1998). Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic Biol Med*, **24**, 450-459.
- Defraigne JO and Pincemail J (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Rev Med Liège*, **63**, 10-19.

- Delaporte RH, Sarragiotto MH, Takemura OS, Sanchez GM, Filho BPD and Nakamura CV (2004). Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker – Bromeliaceae. *J Ethnopharmacol*, **95**, 229–233.
- Delattre J, Beaudoux JL, Bonnefont-Rousselot D (2005). Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Première édition. Eds, Tec et Doc, Lavoisier (Paris), pp: 547.
- Descamps-Latscha B and Witko-Sarsat V (1996). Cytokines pro-inflammatoires et cellules phagocytaires. *Rev Fr Allergol*, **36**, 310- 314.
- Diaz A, Loewen PC, Fita I and Carpena X (2012). Thirty years of heme catalases structural biology. *Arch Biochem Biophys*, **525**, 102-110.
- Dinarello CA (1997). Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation; experimental and clinical finding. *J Biol Regul Haemeosl Agents*. **11**, 91-103.
- Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM and Stocker P (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem Toxicol*, **48**, 2599-2606.
- Djeridane M, Yousfi B, Nadjemi D, Boutassouna P and Stocker N (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, **97**, 654-660.
- Dombrowicz D and Capron M (2001). Eosinophils, allergy and parasites. *Curr Opin Immunol*, **13**, 716-720.
- Duwiejua M and Zeitlin IJ (1993). Plants as source of anti-inflammatory substances. In: *Drugs from Natural Products: Pharmaceuticals and Agrochemicals*. Eds, Taylor & Francis (Royaume-Uni), pp: 153.
- Ellis A and Triggle CR (2003). Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Can J Physiol Pharmacol*, **81**, 1013-1028.
- Eming SA, Krieg T and Davidson JM (2007). Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *J Invest Dermatol*, **127**, 514–525.
- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M and Abdelly C (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C R Biol*, **331**, 372-379.
- Fauve RM and Hevin M (1998). Réaction inflammatoire et réactions immunitaires. In: *Inflammation*. Russo-Marie F, Peltier A, Polla B S. Eds, John Libbey Eurotext (France), pp: 10-19.
- Favier A (2003). Le stress oxydant, interet conceptuel et experimental dans la comprehension des mecanismes des maladies et potentiel therapeutique. *L'actualité Chimique*, **11**, 108-115.

- Favier A (2006). Oxidative stress in human diseases. *Annal Pharmaceutical*, **64**, 390-396.
- Ferreira A, Proenc C, Serralheiro MLM and Araújo MEM (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol*, **108**, 31-37.
- Gardès-Albert M and Jore D (2005). Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène. Radicaux libres et stress oxydant. Eds, Lavoisier (Paris), pp: 1-23.
- Garg R, Ramchandani AG and Maru GB (2008). Curcumin decreases 12-otetradecanoyl phorbol - 13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. *Carcinogenesis*, **29**, 1249-1259.
- Gaudin P, Troemé C, Monier F, Zaoui P, Barro C, Polak B, Hadjan A, Berthier S, Morel F and Grepil JE (1998). Protéolyse matricielle, protéolyse focalisées et inflammation. *Ann Biol Clin*, **56**, 661-669.
- Genestra M (2007). Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*, **19**, 1807-1819.
- Georgé S, Brat P, Alter P and Amiot JM. (2005) Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem*, **53**, 1370-1373.
- Geronikaki AA and Gavalas AM (2006). Antioxidants and Inflammatory Disease: Synthetic and Natural Antioxidants with Anti-Inflammatory Activity. *Comb Chem High Throughput Screen*, **9**, 425-442.
- Glancy RM, Amin AR and Abramson SB (1998). The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Athritis Rheum*, **41**, 1141-1151.
- Goetz P (2011). Phytothérapie de l'inflammation (partie II). *Phyto clin*, **9**, 310-317.
- Guilland JC (2011). Les interactions entre les vitamines A, D, E et K : synergie et/ou compétition. *Nutrition-Sante*, **18**, 59-67.
- Gulcin I, Alici HA and Cesur M (2005). Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chem Pharm Bull*, **53**, 281-285.
- Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein HY (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arab J Chem*, **3**, 43-53.
- Hagerman AE and Butler LG (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *J Chem Ecol*, **15**, 1795-1810.
- Halliwell B and Gutteridge J (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. Eds, Oxford Clarendon Press (New York).
- Hammami S, Ben Salem A, Mastouri M, Falconieri D, Goric M, M'henni MF, Marongiu B and Mighri Z (2013). Essential oil composition and antimicrobial activities of aerial parts from Tunisian *Anacyclus Clavatus* (Desf.). *J. Med. Plants Res*, **7**, 71-75.
- Harald G (1978). Comparative phytochemistry and systematics of *Anacyclus*. *Biochem Syst Ecol*. **6**, 11-17.

- Harrison R (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med*, **33**, 774-797.
- Havesteen BH (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*, **96**, 67.
- Hennebelle T, Sahpaz S and Bailleul F (2004). Polyphenols vegetaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1**, 3-6.
- Henrotin Y, Deby-Dupont G and Reginster JY (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Rev Med Liege*, **56**, 433-442.
- Henzen C (2003). Traitement aux glucocorticoïdes : risques et effets secondaires. *FMS*, **19**, 442-446.
- Hermes-Lima M (2005). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Eds, Wiley-Liss (Hoboken), pp: 319-368.
- Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, Kay AB and Rothenberg ME (2008). Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clin Exp Allergy*, **38**, 709-750.
- Holmdahl L and Ivarsson ML (1999). The role of cytokines, coagulation and fibrinolysis in peritoneal tissue repair. *Eur J Surg*, **165**, 1012-1019.
- Hong JH, Kim MJ, Park MR, Kwag OG, Lee IS, Byun BH, Lee SC, Lee KB and Rhee SJ (2004). Effects of vitamin E on oxidative stress and membrane fluidity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Clin Chim Acta*, **340**, 107-115.
- Huang D, Ou B and Prior RL (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, **53**, 1841-1856.
- Hulbert AJ (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol*, **234**, 277-288.
- Jagels MA, Daffen P J and Hugli T E (2000). C3a and C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial monolayer. Epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. *Immunopharmacology*, **46**, 209-222.
- Jilroy DW, Colvillr-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ and Willoughby DA (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*, **5**, 698-701.
- Jones OTG and Hancock JT (2000). In: Winyard PG, Blake DR and Evans CH. Free Radicals in Inflammation. Eds, Switzerland (Birkha), pp: 21-46.
- Jones WP and Kinghorn AD (2005). Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker S D, Latif Z and Gray AI. Natural products isolation. Eds, Humana Press (Totowa), pp: 323-411.
- Jovanovic SV, steenken S, tosic M, marjanovic B and Simic MG (1994). Flavonoids as antioxidants. *J Am Chem Soc*, **116**, 4846-4851.

- Julien A (1894). Flore de la région de Constantine. Eds, Imprimerie Louis Marle (Constantine).
- Keane MP and Strieter RM (2000). Chemokine signaling in inflammation. *Crit care med*, **28**, 13-26.
- Kim HK, Namgoong SY and Kim HP (1993). Antiinflammatory Activity of Flavonoids: Mouse Ear Edema Inhibition. *Arch Pharm Res*, **16**, 18-24.
- Kintzios S, Papageorgiou K, Yiakoumettis I, Baricevic D and Kusar A (2010). Evaluation of the antioxidants activities of four Slovene medicinal plant species by traditional and novel biosensory assays. *J Pharm Biomed Anal*, **53**, 773-776.
- Kruidenier L and Verspaget HW (2002). Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous? *Aliment Pharmacol Ther*, **16**, 1997-2015.
- Ksouri R, Falleh H, Megdiche W, Trabelsi N, Mhamdi B, Chaieb K, Bakrouf A, Magné C and Abdelly C (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem Toxicol*, **47**, 2083-2091.
- Lafuente AG, Guillamon E, Villares A, Rostagno MA and Martinez JA (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res*, **58**, 537-552.
- Lam FY and Ferrel WF (1991). Specific neurokinin receptors mediate plasma extravasion in the rat knee joint. *Br j pharmacol*, **103**, 1263-1267.
- Le K, Chiu F and Ng K (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem*, **105**, 353-363.
- Lee BH, Annis PC, Tumaalii F and WS Choi (2004). Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major storedgrain insects. *J Stored Prod Res*. **40**, 553-564.
- Levine RL (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med*, **32**, 790-796.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F and Jiang Y (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem*, **102**, 771-776.
- Li Y, Wei G and Chen J (2004). Glutathione: a review on biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol*, **66**, 233-242.
- Manga HM, Brkic D, Marie DEP and Quetin-Leclercq J (2004). In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*, **92**, 209-214.
- Manthey JM (2000). Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirc*, **7**, S28-S34.

- Marla SS, Lee J and Groves JT (1997). Peroxynitrite rapidly permeates phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14243-14248.
- Marston A and Hostettmann K (2006). Separation and Quantification of Flavonoids. In: *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC Taylor & Francis (London). pp: 1-32.
- Matés JM and FM Sánchez-Jiménez (2000). Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* **32**, 157-170.
- McManus JP, Davis KG, Lilley TH and Haslam E (1981). The association of proteins with polyphenols. *Chem Commun*, 309-311.
- Medzhitov R (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, **454**, 428-435.
- Middleton EJR, Kandaswami C and heoradies TC (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*, **52**, 673-751.
- Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R and Tuteja N (2009). Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit*, **15**, 209-219.
- Mohamed S M and Naghibi F (2010). Antioxidant activity of some edible plants of the Turkmen Sahra region in northern Iran. *Food Chem*, **119**, 1637-1642.
- Morel Y, Mermod N and Barouki R (1999). An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NFI. *Mol Cell Biol*, **19**, 6825-6832.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Dominguez H, Nunez MJ and Parajo JC (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, **72**, 145-171.
- Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka Y and Fukuda Y (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF) in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induced skin edema in mice. *Biochem Pharmacol*, **71**, 1331-1336.
- Nathan C (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, **420**, 19-26.
- Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T and Nakagawa Y (2000). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome C from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem J*, **351**, 183-193.
- Ouédraogo N, Lompol M, Sawadogo W, Tibiri1 A, Hay AE, Koudou J, Dijoux MG and Guissou IP (2012). Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*, **10**, 286-292.
- Ozen T (2009). Investigation of antioxidant properties of *Nasturtium officinale* (Watercress) leaf extracts. *Acta Pol Pharm Drug Res*, **66** (2), 187-193.

- Ozen T, Demirtas I and Aksit H (2011). Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem*, **124**, 58-64.
- Packer L, Tritschler HJ and Wessel K (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med*, **22**, 359-378.
- Pamplona R and Costantini D (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **301**, 843-863.
- Pamplona R, Portero-Otin M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A and Barja G (2000) Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev*, **112**, 169-183.
- Pardo de Santayana M and Morales R (2010). Ethnobotany in the new Europe: People, health and wild plant resources. Eds Berghahn Press (Oxford UK), pp: 283-307.
- Payne DNR and Adcock IM (2001). Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Paediatr Respir Rev*, **2**, 145-150.
- Peplow PV and Mikhailidis DP (1990). The potential role of platelet activating factor in shock and ischemia. *J Crit Care*, **5**, 115-136.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R and Defraigne JO (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour le médecin. *VCP*, **4** (5).
- Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF and Hazen SL (1999). Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form *in vitro*. *J Clin Invest*, **103**, 1547-60.
- Pottier Alapetite G (1981). Flore de la Tunisie [Flora of Tunisia]. Angiospermes-Dicotylédones, Gamopétales [Angiosperms, dicotyledons, gamopetalous]. Programme flore et végétation tunisiennes [Program of Tunisian Flora and vegetation]. 651-1189.
- Power SK and Lennon SL (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, **58**, 1025-1033.
- Que F, Mao L and Pan X (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res Int*, **39**, 581-587.
- Quezel P and Santa S (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales [New Flora of Algeria and Southern desert regions]. Editions du centre national de la recherche scientifique [Editions of the National Center of Scientific Research].
- Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H and Kawakishi S (1995). The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci Technol*, **6**, 75.
- Rankin JA (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clin Issues*, **15**, 3-17.

- Rapoport R, Sklan D and Hanukoglu I (1995). Electron leakage from the adrenal cortex mitochondrial P450<sub>scc</sub> and P450<sub>c11</sub> systems: NADPH and steroid dependence. *Arch Biochem Biophys*, **317**, 412-416.
- Rhee SG, Chae HZ and Kim K (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med*, **38**, 1543-1552.
- Richardson JD and Vasko MR (2002). Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. *Pharmacol Exp Ther*, **302**, 839-845.
- Rimbau V, Risco E, Canigueral S and Iglesias J (1999). Anti-inflammatory Activity of Some Extracts from Plants used in the Traditional Medicine of North-African Countries. *Phytother Res*, **13**, 128-32.
- Roussel AM (2009). Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir ? *Cahiers de nutrition et de diététique*, **44**, 230-236.
- Roussel AM, Nève J and Hininger I (2005). Antioxydants et nutrition. Radicaux libres et stress oxydant. Eds, Lavoisier (Paris), pp: 261-280.
- Sahreen S, Khan MR and Khan RA (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem*, **122**, 1205-1211.
- Sanogo R, Maiga A and Diallo D (2006). Activités analgésique et anti-inflammatoire des extraits de *maytenus senegalensis*, *stereospermum kunthianum* et *trichilia emetica* utilisées dans le traitement traditionnel des dysménorrhées au Mali. *Pharm Méd*, **XIV**, 123-136.
- Santains MC, Callens E, Djebbar R and Ruff F (1998). Intérêt potentiel des antileucotriènes dans le traitement de l'asthme et autres pathologies inflammatoires : à propos d'une nouvelle classe pharmacologique. *Rev Med Intern*, **19**, 98-107.
- Schaffer M, Beiter T, Becker HD and Hunt TK (1998). Neuropeptides: mediators of inflammation and tissue repair. *Arch Surg*, **133**, 1107-1116.
- Seidel V (2005). Initial and Bulk Extraction. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. Eds, Humana Press (Totowa), pp: 27-37.
- Selles C, Dib MA, Allali H and Tabti B (2012). Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of solvent extracts of *Anacyclus pyrethrum* L., from Algeria. *Mediterr J Chem*, **2**, 408-415.
- Setty AR and Sigal LH (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Semin Arthritis Rheum*, **34**, 773-784.
- Shahidi F and Naczk M (2003). Antioxidant properties of food phenolics. Phenolics in food and nutraceuticals. Eds, CRC Press (Boca Raton), pp: 403-442.
- Simon LS (1999). Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med*, **106**, 37-42.

- Skulachev VP (1998). Cytochrome C in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett*, **423**, 275-280.
- Stadtman ER and Levine RL (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, **25**, 207–218.
- Steinhubl SR (2007). Platelets as Mediators of Inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am*, **21**, 115-121.
- Stichtenoth DO and Frolich JC (1998). Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol*, **37**, 246-257.
- Su X, Duan J, Jian Y, Shi J and Kakuda Y (2006). Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *J Food Compost Anal*, **19**, 348-353.
- Sylvestre M, Pichette A, Longtin A, Nagau F and Legault J (2006). Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J Ethnopharma*. **103**, 99-102.
- Szabo C, Ischiropoulos H and Radi, R (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **6**, 662-680.
- Takatoshi M, Noriaki K, Tadashi H, Yusuke S, Yoshinori N, Ichiro T and Toru K (1999). Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 1412-1420.
- Tardío J, Pardo de Santayana M and Morales R (2006). Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Bot J Linnean Soc*. **152**, 27-71.
- The Local Food-Nutraceutical Consortium (2005). Understanding local Mediterranean diets. A multidisciplinary pharmacological and ethno botanical approach. *Pharma Res*, **52**, 353-366.
- Thérond P and Blache D (2005a). Cibles lipidiques des radicaux libres dérivés de l'oxygène et de l'azote - Effets biologiques des produits d'oxydation du cholestérol et des phospholipides. Radicaux libres et stress oxydant. Eds, Lavoisier (Paris), pp: 113-146.
- Thérond P and Bonnefont-Rousselot D (2005b). Systèmes antioxydants endogènes. Radicaux libres et stress oxydant. Eds, Lavoisier (Paris), p: 87-111.
- Tubaro A, Dri P, Delbello G, Zilli C and Della Loggia R (1985). The Croton oil ear test revisited. *Agents Actions*, **17**, 3-4.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Croninc MTD, Mazura M and Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 44-84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovica M and Mazura M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, **160**, 1-40.

- Van Acker SABE, van den Berg DJ, Tromp MNJL, Griffioen DH, Bennekom V, Van der Vijgh WP and Bast WJF (1996). Structural aspect of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad Biol Med*, **20**, 331-342.
- Van der pouw TC, Boeijie LC, Smeenk RJ, Wijdenes J, and Aarden LA (1995). Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of human interleukin-12 production. *J Exp Med*, **181**, 775-779.
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P and Pritchard KA (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9220-9225.
- Verdan AM, Wang HC, García CR, Henry WP and Brumaghim JL (2011). Iron binding of 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, and sulfonated morin: Implications for the antioxidant activity of flavonols with competing metal binding sites. *J Inorg Biochem*, **105**, 1314-1322.
- Wantana R, Tassanee N and Subhadhirasakul S (2009) Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Putranjiva roxburghii* Wall. Leaf extract in experimental animals. *J Nat Med*, **63**, 290-296.
- Wardman, P and Candeias LP (1996). Fenton Chemistry: An Introduction. *Radiat Res*, **145**, 523-531.
- Watanabe T, Misawa S, Hiradate S and Osaki M (2008). Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytol*, **178**, 581-589.
- Weill B, Batteux F and Dhainaut J (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, De Boeck Université (Paris), pp: 12-23.
- Whiteman M, Ketsawatsakul U and Halliwell B (2002). A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid. *Ann N Y Acad Sci*, **962**, 242-259.
- Wiert C (2006). Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and the Pacific. Eds, Humana Press (Totowa), pp: 1-20.
- Williams LW, Burks W and Steele RW (1988). Complement: function and clinical relevance. *Ann Allergy*, **60**, 293-301.
- Winter CA, Risley EA and Nuss GW (1962). Carrageenan induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, **11**, 544-547.
- Yadav SA, Raj AJ and Sathishkumar R (2012). In vitro antioxidant activity of *Barleria noctiflora* L. *Asian Pac J Trop Biomed*. S716-S722.
- Yi-Qun Y, Xia D, Yi-Chang J, Chuan-Xin H, Yi-Zheng W and Ying-Hui X (2008). Anti-tumor effect of  $\beta$ -elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. *Cancer Lett*. **264**, 127-134.
- Ziltener JL, Leal S and Fournier PE (2010). Anti-inflammatoires non stéroïdiens en médecine du sport : utilité et controverses. *Ann Phys Rehabil Med*, **53**, 278-288.

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للالتهاب و المضاد للأكسدة لكل من المستخلص المائي و الميثانولي للجزء الهوائي لنبته *Anacyclus clavatus*. في البداية تم تقدير محتوى المستخلصين من المركبات متعددة الفينول والفلافونويدات والدباغ. فبينت النتائج أن المستخلص الميثانولي يحتوي على أكبر نسبة من متعددات الفينول و الدباغ في حين أن المستخلص المائي يحتوي على نسبة أكبر من الفلافونويدات. لدراسة الالتهاب الحاد استعملت 3 نماذج : وذمة الاذن المحفزة بزيت croton , وذمة القدم المحفزة بمادة carragénine و التهاب الجنب المحفز أيضا بمادة carragénine. أظهرت المعالجة الموضعية للفئران ب 2 ملغ للاذن من المستخلص الميثانولي و المائي تثبيطا معنويا للوذمة قدر ب 84 % و 83 % على التوالي. هذه النتائج احسن من المتحصل عليها مع مضاد الالتهاب المرجعي (اندوميثاسين). في حين ان المعالجة المسبقة للجرذان عن طريق الفم بالجرعات 200 ملغ/كغ او 400 ملغ/كغ من المستخلص الميثانولي او المائي أبدت تأثيرا معنويا ضد التهاب القدم ابتداء من الساعة الاولى. كما بينت النتائج ان المستخلص المائي 200 ملغ/كغ أعطى مفعولا أكبر من بقية الجرعات و أكبر من الأسبرين الذي استعمل للمقارنة. كما ان معالجة الفئران عن طريق الفم ب 400 ملغ/كغ من المستخلصين أدى إلى انخفاض كبير في تطوير التهاب الجنب و هجرة الخلايا البيضاء المتعادلة. من جهة أخرى تم تقييم القدرة المضادة للأكسدة للمستخلصين باستعمال كل من اختبار جذر DPPH و استخلاص المعادن و أكسدة حمض اللينوليك و كذلك اختبار القدرة على الإرجاع. أظهر كل من المستخلص المائي و الميثانولي نشاطية إزاحية جد عالية لجذر DPPH أكبر من نشاطية مضاد الأكسدة المرجعي BHT المستخدم للمقارنة. كما أظهر المستخلصان قدرة تمحلب معتبرة اتجاه الأيونات و قدر التركيز الممارس ل 50% من الفعل التمثلي ب  $74,64 \pm 11,68$  ميكروغرام/مل و  $152,93 \pm 1,67$  ميكروغرام/مل، على التوالي. كما ثبت التركيز المستخدم من المستخلص المائي و الميثانولي أكسدة حمض اللينوليك ب قيم 76 % و 75 % على التوالي. وهذه القيم قريبة من القيم المتحصل عليها مع مضاد الأكسدة المرجعي (BHT). إضافة إلى ذلك يملك المستخلصان قدرة ارجاع مهمة تعتمد على التركيز. من خلال النتائج المتحصل عليها يمكن استخلاص أن نبات *Anacyclus clavatus* يمتاز بخصائص مضادة للالتهاب و للأكسدة، ما يدعم استعمالها في الطب التقليدي.

**الكلمات المفتاحية:** *Anacyclus clavatus*، الالتهاب، مضادات الالتهاب، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة.

## Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire et antioxydante de l'extrait aqueux (E.Aq) et l'extrait méthanolique (E.Met) de la partie aérienne d'*Anacyclus clavatus*. La teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tannins des deux extraits a été évaluée. Les résultats montrent la richesse de l'E.Met en polyphénols et en tannins par rapport à l'E.Aq qui est le plus riche en flavonoïdes. Le traitement par 2 mg/oreille de l'E.Met ou l'E.Aq a inhibé l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez les souris avec 84 % et 83 % respectivement. Ces valeurs sont supérieures à ceux obtenus par l'indométacine utilisée comme anti-inflammatoire de référence. De même, le prétraitement par voie orale des rats par l'E.Met ou l'E.Aq à 200 et 400 mg/kg prévient de façon significative l'œdème de la patte induit par la carragénine. Cette inhibition est plus importante avec 200 mg/Kg de l'extrait aqueux. L'effet des extraits sur la pleurésie induite par la carragénine montrent que l'administration orale de 400 mg/kg d'E.Met ou E.Aq provoque une diminution significative du développement de la pleurésie et la migration des neutrophiles. Ces effets sont inférieurs que ceux obtenus avec l'aspirine, utilisée comme anti-inflammatoire de référence. L'activité antioxydante a été évaluée en utilisant les tests du radical DPPH, chélation, peroxydation de l'acide linoléique et le test du pouvoir réducteur. Les résultats montrent que l'E.Met et l'E.Aq possèdent une forte activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical DPPH avec des IC<sub>50</sub> de  $28,30 \pm 3,45$  µg/ml et  $68,98 \pm 1,64$  µg/ml respectivement. De même, une bonne activité chélatrice a été obtenue par les 2 extraits avec des IC<sub>50</sub> de  $74,64 \pm 11,68$  µg/ml et  $152,93 \pm 1,67$  µg/ml respectivement. Les 2 extraits ont inhibé la peroxydation de l'acide linoléique avec 76 % et 75 % respectivement. Ces valeurs sont similaires à celles de BHT utilisé comme antioxydant de référence. De plus, les 2 extraits possèdent un pouvoir réducteur important concentration-dépendant. En conclusion, les extraits de la partie aérienne de l'*Anacyclus clavatus* ont des propriétés antioxydante et anti-inflammatoire qui supportent leur usage en médecine traditionnelle.

**Mots clés :** *Anacyclus clavatus*, Inflammation, Anti-inflammatoire, Stress oxydatif, Antioxydant.