الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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

جامعة فرحات عباس سطيف 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

N°……/SNV/2014

Département de Biochimie

THESE

Présentée par

DIAFAT Abdelouahab

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie

THEME :

Evaluation des effets anti-arthritique et toxique de l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva*

Soutenue publiquement le …/…/2014

Devant le jury

Président :	**Pr BAGHIANI Abderrahmane**	Pr.	UFA. Sétif 1
Directeur :	**Pr ARRAR Lekhmici**	Pr.	UFA. Sétif 1
Examinateurs :	**Pr LAHOUEL Mosbah**	Pr.	Univ. Jijel
	Pr KHELIFI-TOUHAMI Fatima	Pr.	Univ. Constantine 1

.

Laboratoire de Biochimie appliqué

REMERCIEMENT

Je remercie Allah et je lui rends grâce de m'avoir donné foi et volonté pour la réalisation de ce travail.

Je remercie **Pr Lekhmici ARRAR**, professeur à l'université Sétif 1, qui a proposé et suivi le travail de cette thèse et pour tout le temps et l'intérêt qu'il m'a consacré à mon travail. Sa bienveillance et ses conseils m'ont vraiment touché, et sa grande expérience de chercheur m'a beaucoup appris

Je remercie très sincèrement **Pr Abderrahmane BAGHIANI**, professeur à l'université Sétif 1, de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance de ma thèse.

J'exprime ma profonde gratitude au **Pr Mosbah LAHOUEL**, professeur à l'université de Jijel, et **Pr Fatima KHELIFI-TOUHAMI**, professeur à l'Université Mentouri Constantine 1, pour avoir accepté d'examiner ce travail, et pour l'honneur qu'ils me font en participant au jury de cette thèse.

J'exprime mes forts remerciements :

- A messieurs, Derradji Yacine et Satta rabeh pour m'avoir aidé dans la réalisation de ce travail.
- A messieurs, Bouaziz Farid, Khadara, Taibi Hocine et Brahimi pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.
- Au personnel du laboratoire du Biologie *(belkacem, naceredine, zino, nawel, yasmina)* qui ont contribué chacun de son coté à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à mener a bien ce travail.

TABLE DES MATIERES

Remerciements I

Liste des abréviations II

Liste des tableaux..... III

Liste des figures.....IV

INTRODUCTION 1

1. L'ARTHRITE RHUMATOÏDE (AR) 3

1.1. Définition.....3

1.2. Epidémiologie.....3

1.3.Facteurs de risque.....4

1.3.1. Facteurs hormonaux.....4

1.3.2. Facteurs génétiques.....5

1.3.3. Facteurs environnementaux.....6

1.3.4. Tabagisme 7

1.3.5. Les facteurs nutritionnels 7

1.4. Mécanismes physiopathologique.....7

1.4.1. Initiation de la réponse immunitaire …….....9

1.4.2. Développement de l'inflammation dans l'articulation.....9

1.4.2.1.Initiation de l'inflammation 9

***1.4.2.2.*Phase de destruction articulaire**.....12

1.5. Les signes cliniques 13

1.5.1. L'arthrite rhumatoïde au début.....13

***1.5.1.1.Signes cliniques*.** 13

***1.5.1.2.*Signes radiologiques** 13

1.5.1.3.Signes biologiques.....14

1.5.2. L'arthrite rhumatoïde à un stade avéré.....14

1.5.2.1.Signes cliniques 14

1.5.2.2.Signes radiologiques 15

1.5.2.3.Signes biologiques**.....** 15

1.5.2.4.Signes histologiques**....** 17

1.5.3. L'arthrite rhumatoïde à un stade séculaire..... 17

1.5.4. Les manifestations extra-articulaires..... 17

1.5.4.1.Les nodules rhumatoïdes.....……..... 17

1.5.4.2.Les manifestations pleuro-pulmonaires 18

1.5.4.3.Les manifestations cardiaques .....……..... 19

1.5.4.4.Vascularite rhumatoïde 19

1.6. Biologie de l'arthrite rhumatoïde 19

***1.6.1.* Liquide synovial ....…19**

1.6.2. Le facteur rhumatoïde..... .....…20

1.6.3. Les anti-fillagrines..... .....…20

1.7. Traitement de l'arthrite rhumatoïde.....…20

1.7.1. Traitement symptomatique 21

***1.7.1.1.* Les Anti-inflammatoires non stéroidïens (AINS) 21**

***1.7.1.2.*Les corticostéroïdes..... .....21**

1.7.2. Traitement de fond..... 22

1.7.2.1.Traitements de fond classiques 22

1.7.2.2.Nouveaux traitements (La biothérapie).....24

1.7.2.3.Stratégies thérapeutiques.....30

2. LA PHYTOTHERAPIE 32

2.1.**La phytotherapie anti arthritique..... 32**

2.1.1. **L'écorce du saule blanc..... 32**

2.1.2. **La spirée ulmaire 32**

2.1.3. **L'Aloès *vera*……..... 33**

2.1.4. **Le Boswellia serrata..... 34**

2.1.5. **La griffe du diable.....34**

2.1.6. **La griffe de chat.....34**

2.1.7. **Le curcuma longa et le gingembre.....34**

2.1.8. **Le piment de Cayenne..... ..35**

2.2.**Principales substances végétales actives.....35**

2.2.1. **Les composés phénoliques.....35**

2.2.2. **Les flavonoïdes..... .....38**

2.2.2.1.Structure chimique et classification.....39

2.2.2.2.Propriétés biologiques des flavonoïdes.....40

2.2.3. **Les tanins**.....42
2.2.4. **Les saponosides**..... 43
2.2.5. **Alcaloïdes**.....43
3. LA PLANTE MEDICINALE *AJUGA IVA*.....44
3.1.**Distribution géographique et habitat**.....45
3.2.**Nomenclature de la plante**..... 45
3.3. **Composition chimique de la plante**..... 45
3.4. **Utilisation traditionnelle de la plante**.... 47
3.5.**Propriétés biologiques d'*Ajuga iva*.... 48
4. MODELES ANIMAUX DE L'ARTHRITE 49
4.1.**Provocation de l'arthrite chez les rats** 50
4.1.1. **Le modèle d'arthrite induite par le collagène**.....50
4.1.1.1.*Importance du collagène de type II*.....51
4.1.2. **Arthrite provoque par les cellules streptococcique** 51
4.1.3. **Le modèle de l'arthrite induite par l'adjuvant**.....52
4.2. Provocation de l'arthrite chez les souris.....53
4.2.1. Le modèle d'arthrite induite par le collagène.....53
4.2.2. Modèles de transfert passif.....56
4.2.3. Modèles d'arthrite induite à l'antigène.....57
4.2.3.1.Arthrite induite par la BSA.....57
4.2.3.2.Arthrite induite aux adjuvants …….....58
4.2.3.3.Arthrite induite au protéoglycane.....58
4.2.3.4.Arthrite induite aux Streptocoques ……...58

Partie Expérimentale

MATERIELS ET METHODES 59
1. Matériels 59
1.1. Matières végétales 59
1.2. Animaux 59
1.3. Réactifs 60
2. Méthodes 60
2.1 Extraction de l'*Ajuga iva*.....60
2.2. Dosage des polyphénols totaux.....60

2.3. Dosage des flavonoïdes.....61
2.4. Provocation de l'arthrite par le collagène type II chez les rats.....61
2.5. Traitement préventif et curatif par l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva*.....62
2.6. Evaluation des signes cliniques de l'arthrite 62
2.7. Prélèvement du sang 63
2.8. La vitesse de sédimentation des globules rouges 63
2.9. Dosage de la protéine C réactive 63
2.10. La numération formule sanguine 63
2.11. La réalisation des coupes histologiques 64
2.11.1. Préparation des blocs 64
2.11.2. Réalisation des coupes, coloration et observation 64

3. ETUDE DE L'EFFET TOXIQUE DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE D'*AJUGA IVA* …….. 65

3.1. Toxicité aiguë chez les souris.....65
3.2. Toxicité subaigüe chez les rats 65
3.2.1. Évaluation des paramètres hématologiques et biochimiques.....66
3.2.1.1. Évaluation des paramètres hématologiques.....66
3.2.1.2. Évaluation des paramètres biochimiques.....66
3.3.Test sur la reproduction 69
3.4.Analyse statistique 69

Résultats et Discussion

Résultats

1. COMPOSITION DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE D'AJUGA IVA EN COMPOSES PHENOLIQUES.....71
2. EFFET DE L'EXTRAIT D'*AJUGA IVA* SUR LES SIGNES CLINIQUES DE L'ARTHRITE 72
2.1. Provocation de l'arthrite chez le rat Wistar.....72
2.2. Effets préventifs de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva*.....74
2.2.1. Effets sur le score de l'arthrite 74
2.2.2. Effet de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* sur le poids corporel.....74

2.2.3. Effet de EMAI sur la vitesse de sédimentation 76
2.2.4. Effet de l'extrait de A *iva* sur la CRP 77
2.2.5. Dénombrement des globules blancs 78
2.2.6. Effet de AI sur les changements histologiques.....79
2.3.Effets curatifs de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva*.....80
2.3.1. Les signes cliniques 80
2.3.2. Effet de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* sur le poids corporel.....82
2.3.3. Effet de EMAI sur la vitesse de sédimentation 82
2.3.4. Effet de l'extrait de l'AI sur la CRP 84
2.3.5. Dénombrement des globules blancs 84
2.3.6. Effet de AI sur les changements histologiques.....85
3. ETUDE DE L'EFFET TOXIQUE DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE D'AI CHEZ LES RONGEURS 86
3.1.Toxicité aigue 86
3.2.Études de toxicité chroniques chez les rats 88
3.2.1. Effet sur le poids corporel et la mortalité *88*
3.2.2. Effet de l'administration chronique par voie orale de l'extrait d'*AI* sur les paramètres hématologiques des rats. *90*
3.2.2.1. Effet de traitement sur le nombre des globules blancs 91
3.2.2.2. Effet de traitement sur le nombre des plaquettes 91
3.2.2.3. Effet du traitement sur le nombre des globules rouges 92
3.2.2.4. Effet de traitement sur l'hémoglobine 92
3.2.2.5. Effet de traitement sur l'hématocrite 92
3.2.3. Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur les paramètres biochimiques.....93
3.2.3.1.Effet sur le taux de Glucose 93
3.2.3.2.Effet sur le taux d'urée.....95
3.2.3.3.Effet sur le taux de Créatinine.....96
3.2.3.4.Effet sur le taux de cholestérol.....97
3.2.3.5.Effet sur le taux des triglycérides.....98
3.2.3.6.Effet sur le Taux d'ASAT 99
3.2.3.7.Effet sur le taux d'ALAT.....100
3.2.4. Effet sur le poids des organes..... 101
3.2.5. Les coupes histologiques 101

3.3.Effet sur la reproduction.....103

Discussion.....104

Conclusion *111*

Référence bibliographique

Liste des abréviations

AA: Adjuvant Arthritis

AC: Anticorps

ACPA: Anti-citrullinated Protein Antibody

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADP : adénosine diphosphate ;

Ag: Antigène

Ai : Ajuga iva

AIA : Antigen-Induced Arthritis

AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens

AKA: Ac antikératine

AMM: autorisation de mise sur le marché

Anti-CCP : Antipeptides cycliques citrullinés

AP1: activator protein 1

APN: anti-périnucléaire

APRIL: a proliferation-inducing ligand

AR: Arthrite Rhumatoïde

ARN: Acide RiboNucléique.

ATP: adénosine triphosphate ;

BAFF: B-cell activation factor

BAFFR: récepteur du B-cell activation factor,

BHA : butylhydroxyanisole

BHT : butylhydroxytoluène

BSA : Bovine Serum Albumin

C : chondrocyte,

CAM : molécules d'adhérence cellulaire

CC : chimiokines

CCP : protéine cyclique citrullinée

CD : cellule dendritique

CFA : Adjuvant complet de Freund's

CIA: Collagen Induced Arthritis

CII: Collagène Type II

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

COX : cyclo-oxygénase (1, 2)

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CpG : cytosine phosphate guanine

CRP : La protéine C-réactive

CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte–associated protein 4

CXC, CC : récepteurs des chimiokines

DAMPs : damage-associated molecular patterns

DBA/1 : Dilute Brown, non-Agouti mice

DC-STAMP : Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein

DDA : Diméthyl-DioctadecylAmmonium Bromide

DMARDs : disease-modifying anti-rheumatic drugs

E : endothéliales

EAG : équivalent d'acide gallieque

EGF : epidermal growth factor

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EQ : équivalents de quercétine

ERK : extracellular signal-regulated kinase

Fab : Fragment antigen binding

FAK : focal adhesion kinase

Fc : Fragment constant

FGF : fibroblast growth factor,

FLIP : Fas-associated death domain-like IL-1β-converting enzyme inhibitory protein

FLS : fibroblast-like synoviocyte

FNS: Numération Formule Sanguine

FR: Facteur rhumatoïde

GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ;

gp : glycoprotein

GPI : Glucose-6-Phosphate Isomérase

Hb : Hémoglobine

HCQ : hydroxychloroquine

HEV : high endothelial veinule

HHDP : héxahydroxydiphénique

HLA : Human Leukocyte Antigen

HSP : Heat shock protein

ICAM : intercellular adhesion molecule

IFA : Adjuvant incomplet de Freund's

IFN : interféron

Ig (-A, -E, -M, -G) : Immunoglobuline

IKK : I kappa B kinase

IL (-1, -4, -6, -10, -17) : Interleukine(-1, -4, -6, -10, -17)

IL1 Ra : antagoniste du récepteur de l'IL-1

IM : intramusculaire

IPP : Interphalangiennes proximales.

IRAK : IL-1RI-associated protein kinase

IRF : interferon regulatory factor

IκB : Inhibitor of NF-κB

J : jour

JAK : Janus Kinases

JAK/STAT : janus kinase/signal transducer and activator of transcription

Kg : kilogramme

LB : Lymphocyte B

LED : Lupus Erythémateux Disséminé

LEF : Leflunomide

LPS : LipoPolySaccharide

LT : Lymphocyte T

M: macrophage

MAPK: mitogen activated protein kinase

MCP : monocyte-chemoattractant protein

MCP: Métacarpophalangiennes

M-CSF: macrophage colony-stimulating factor

MDP : Muramyl Di-Peptide

MIP : macrophage inflammatory protein

MMPs (-1, -2, -3, -8, -9) : Matrix Metalloproteinases

MTP : Métatarsophalangiennes

MTX: Méthotrexate

NFjB: nuclear factor kappa B

O: ostéoclaste

ODF: Osteoclast Differentiation Factor

OH : hydroxyles

OPG : ostéoprotégérine

P : phosphore

PAD: peptidylarginine déiminase

PAMP: pathogen-associated molecular pattern

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PG: peptidoglycan

PGE2: prostaglandine E2

PGPS: PeptidoGlycane-PolySaccharide

PI 3 K : phospho-inositides 3 kinase

PI: phosphatidylinositol

PK: protéines kinases

PKC: protéine kinase C

PLC: phospholipase C

PNN: polynucléaires neutrophiles

PR: Polyarthrite rhumatoïde

PRR: pattern recognition receptor

PTK: protéine tyrosine kinase

PTPN22: tyrosine phosphate non-receptor type 22

Pyk: proline-rich tyrosine kinase »

R : Récepteur

RA33 : Ribonuclepprotein A2/B1

RANK: receptor activator of nuclear factor κB

RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa B .ligand

RANTES: Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted

ROS: reactive oxygen species

RT: reverse transcription »

RTK : récepteur des protéines tyrosines kinases ;

RTX : Rituximab

S/C : sous cutanée

S: ynoviocyte,

SCW: Streptococcal Cell Wall

SLE: Systemic Lupus erythematosus)

SOD: superoxydes dismutases

STAT: signal transducer and activator of transcription

sTNF-R : récepteur soluble du TNFa

Syk: Spleen tyrosine Kinases

Syno. F : synoviocytes fibroblastiques

SZP : Sulfasalazine

TCR : T cell receptor.

TGFR: récepteur de TGFβ

TGFβ: transforming growth factor β

Th (-1, -2, -17): T helper **(-1, -2, -17)**

TLR: toll like receptor

TNF-R: récepteur soluble du TNF

TNFα: tumor necrosis factor α

TRAF : TNF-receptor-associated factor

Treg: lymphocyte T régulateur,

VCAM: vascular cell adhesion molecule

VEGF: vascular endothelial growth factor

VR : vascularite rhumatoïde

VS : Vitesse de sédimentation

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques.....46

Tableau 2 : Toxicité aiguë de l'extrait méthanolique *d'Ajuga iva* administré par injection intra péritonéale aux souris Albinos.....96

Tableau 3 : Classe de toxicité selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943).....97

Tableau 4 : Changement du poids corporel des rats après l'administration chronique de l'extrait méthanolique de l'Ajuga iva par voie orale.....98

Tableau 5 : Valeurs des paramètres hématologiques après 30, 60 et 90 jours de l'administration l'extrait methanolique de l'*Ajuga iva* par voie orale chez les rats……...…….....99

Tableau 6 : Changements des paramètres biochimique après 30, 60 et 90 jours de l'administration l'extrait methanolique de l'*Ajuga iva* par voie orale chez les rats……...……...103

Tableau 7 : Effets de différentes doses de l'extrait méthanolique *d'Ajuga iva* sur le poids du foie et du rein chez les rats.....111

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Différentes phases de la physiopathologie de la l'arthrite rhumatoïde (AR) …..8

Figure 2 : Les Rôle de la protéine cyclique citrullinée dans le déclenchement de la maladie…….…11

Figure 3: Déformations caractéristiques des mains au cours de l'AR ……..….24

Figure 4: Stades radiographiques (radiographie des mains destructions articulaires et du coude rhumatoïde caractéristiques de l'AR)……...….25

Figure 5: Nodules rhumatoïdes……. .27

Figure 6 : Les cibles de la biothérapie dans le traitement de l'arthrite .....……...38

Figure 7 : Photo de quelques plantes utilises dans le traitement de l'arthrite……...42

Figure 8 : Classification des polyphénols selon la structure chimique…….45

Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes……...……..48

Figure 10 : Les principales classes de flavonoïdes…….……49

Figure 11: Quelques photos d'*Ajuga iva*…….……53

Figure 12: Structures de quelques composés diterpénoïdes et phytoecdystéroïdes de l'*Ai*.55

Figure 13 : Structures chimique de quelques composés de flavonoïdes isolés a partir de l'*Ai*……56

Figure 14 : Schéma de l'inflammation et de la résorption osseuse développée dans le modèle CIA…….59

Figure 15 : Le système du complément un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative …….....64

Figure 16 : Modèle de transfert de sérum de souris K/BxN ……...…65

Figure 17: la plante d'*Ajuga iva* recoltée a partir de la région de Maaza 40 Km de sud de Bordj Bou Arreridj

Figure 18: Courbes d'étalonnage de l'acide gallique.....71

Figure 19: Courbe d'étalonnage de la quercétine.....72

Figure 20: Les signes cliniques de l'arthrite (arthritic score) observés après 21 jours de l'induction de l'arthrite par le collagène type II.....73

Figure 21: Le développement des signes cliniques (arthritic score) chez les rats (Albinos Wistar), des groupes préventifs traités par les doses 30 et 60 mg de l'extrait méthanolique de l'AI/kg de poids corporel de rat.....75

Figure 22 : Changement du poids corporel en fonction de temps chez les groupes préventifs traités par les doses 30 et 60 mg de l'extrait méthanolique de l'AI/kg de poids corporel de rat..... **76**

Figure 23 : la vitesse de sédimentation (VS). des groupes préventifs traités par les doses 30 et 60 mg de l'extrait méthanolique de l'*AI*/kg de poids corporel de rat.....77

Figure 24 : Le taux de la proteine C dans le sérum des rats des groupes préventifs traités par les doses 30 et 60 mg de l'extrait méthanolique de l'*AI*/kg de poids corporel de rat.. 78

Figure 25 : Le nombre des leucocytes dans le sang des rats des groupes préventifs traités par les doses 30 and 60 mg de l'extrait méthanolique de l'AI/kg de poids corporel de rat……..79

Figure 26 : Coupes histologiques au niveau des articulations des rats.....80

Figure 27: Le développement des signes cliniques (arthritic score) chez les rats (Albinos Wistar) des groupes curatifs traités par les doses 100 et 150 mg de l'extrait méthanolique de l'AI/kg de poids corporel de rat.....81

Figure 28 : Changement du poids corporel en fonction de temps chez les groupes curatifs traités par les doses 100 et 150 mg de l'extrait méthanolique de l'AI/kg de poids corporel de rat.....82

Figure 29 : la vitesse de sédimentation (VS), chez les groupes curatifs traités par les doses 100 et 150 mg de l'extrait méthanolique de l'AI/kg de poids corporel de rat.....83

Figure 30 : Le taux de la proteine C dans le sérum des rats chez les groupes curatifs traités par les doses 100 et 150 mg de l'extrait méthanolique de l'*AI*/kg de poids corporel de rat…….....84

Figure 31 : Le nombre des leucocytes dans le sang des rats chez les groupes curatifs traiter par les doses 100 et 150 mg de l'extrait méthanolique de l'AI/kg de poids corporel de rat……..85

Figure 32 : La courbe Dose-mortalité de l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva* administre par voie intra péritonéale chez des souris Albinos. 88

Figure 33 : Changements du poids corporel des rats après l'administration chronique de l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva* par voie orale.....90

Figure 34: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de glucose. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement.....94

Figure 35: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de l'Uree. Après 4, 8

et 13 semaines de traitement.....95
Figure 36: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de Créatinine. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement.....96
Figure 37: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de Cholesterol. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement.....97
Figure 38: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de Triglyceride. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement.....98
Figure 39: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de GOT. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement.....99
Figure 40: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de GPT. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement.....100
Figure 41: Coupe histologique au niveau de différents organes.....101
Figure 42: Coupe histologique au niveau des testicules……...102

INTRODUCTION

L'arthrite rhumatoïde (AR) ou polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique et systémique de la membrane synoviale, et par la destruction progressive et érosive des articulations. L'AR reste une maladie relativement fréquente, elle affecte 1% de la population adulte et touche environ 600.000 cas en Algérie, avec 4500 nouveaux cas chaque année. L'étiologie et la pathogénicité de cette maladie ne sont pas entièrement connues, mais plusieurs facteurs peuvent être impliqués tel que, les facteurs hormonaux, génétiques et environnementaux. Les recherches ont permis de comprendre les mécanismes immunologiques de l'AR, mais les causes initiales demeurent inconnues.

La plupart des molécules actuellement utilisées dans le traitement du cette maladie ont des effets secondaires et toxiques qui empêchent leur utilisation à long terme. Aucune mesure préventive n'est actuellement envisageable et aucun traitement étiologique n'est capable de l'éradiquer. Pour pallier aux effets indésirables des traitements anti-arthritiques, les recherches portent sur plusieurs plantes utilisées traditionnellement pour soulager des troubles liés aux maladies rhumatismales.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que 80% de la population mondiale utilisent les plantes comme remède, ce qui indique le rôle des plantes médicinales dans l'entretien de la santé et le traitement des maladies. Cet intérêt croissant des pratiques médicales alternatives indique clairement le besoin de faire des recherches sur la sûreté et l'efficacité de ces traitements et sur leurs effets indésirables et toxiques. Parmi ces traitements la plante *Ajuga iva* (localement appelée Chendgoura) a été largement utilisée dans la médecine traditionnelle algérienne pour traiter différentes maladies dont le diabète, l'hypertension, les douleurs liées aux inflammations articulaires et les maladies gastriques. Elle a aussi des effets, antifongiques et antimicrobiens.

Plusieurs études ont montré que l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* présente une gamme d'activités biologiques et pharmacologiques; un effet hypoglycémiant, vasorelaxant, hypolipidémiant, antifongique, antibactérien, et anti-hypertensif, ce qui peut justifier l'utilisation thérapeutique de cette plante dans la médecine traditionnelle. Aucune étude n'a été effectuée pour évaluer l'effet antiarthritique de la plante.

Dans la présente étude, l'effet antiarthritique de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* dans l'arthrite rhumatoïde a été évalué en utilisant un modèle animal de l'arthrite induite chez le rat par le collagène II (CIA) qui est une protéine constitutive principale du cartilage articulaire. C'est un modèle semblable à l'arthrite inflammatoire humaine, en termes de dispositifs cliniques, histologiques et immunologiques aussi bien que prédisposition génétique. Dans la présente étude nous avons évalué l'effet de l'extrait d'*Ajuga iva* sur la progression de la maladie chez les rats, au moyen du suivi de la vitesse de sédimentation des globules rouges, du taux de la CRP et des paramètres biochimiques et hématologiques. De plus, et pour s'assurer de la sécurité de l'utilisation de cette plante, une étude de toxicité de l'extrait méthanolique a été effectuée.

1. ARTHRITE RHUMATOÏDE

1.1. Définition

Le terme «arthrite», du grec arthron: articulation, désigne toutes les affections inflammatoires qui touchent les articulations de manière aiguë ou chronique. L'arthrite rhumatoïde (AR) ou polyarthrite rhumatoïde (PR) a été décrite pour la première fois par Landré Beauvais en 1800 sous le nom de goutte asthénique puis en 1853 par Charcot sous le nom de rhumatisme articulaire progressif. Elle fut désignée sous le nom d'arthrite rhumatoïde par Garrod, en 1859 à Londres (Eyquem et de Saint Martin, 1981). L'AR est un rhumatisme inflammatoire responsable d'une destruction de l'articulation qui contribue à une impotence fonctionnelle parfois majeure. Malgré les progrès considérables dans la compréhension de la physiopathologie de cette maladie, son origine reste toujours inconnue. Plusieurs facteurs interviennent dans le déclenchement de l'AR : hormonaux, génétiques et environnementaux (Sany *et al.*, 1997). Lorsque ces facteurs sont réunis, ils activent une réponse immunitaire innée et acquise incontrôlée se traduisant par une réaction inflammatoire exagérée, en particulier de la membrane synoviale (Firestein *et al.*, 2003). Cette synoviale est une structure habituellement paucicellulaire avec une couche bourdante mince. La synoviale rhumatoïde est en revanche infiltrée par des cellules comprenant principalement des macrophages, des lymphocytes B et des lymphocytes T $CD4^+$ qui s'organisent en agrégats lymphoïdes avec parfois des centres germinaux dont la structure rappelle celle d'un ganglion (Sany, 2003). La synoviale rhumatoïde se caractérise également par une prolifération de la couche bourdante qui est composée de synoviocytes et de macrophages, mais aussi par une prolifération importante de néo vaisseaux (Sany, 2003). L'AR est classée parmi les maladies auto-immunes en raison de nombreux signes d'auto-réactivité, avec la présence d'autoanticorps comme les facteurs rhumatoïdes et les anticorps anti-fillagrine (Sany, 2003). La physiopathologie de la AR pourrait être comparée à un puzzle dont certaines pièces sont aujourd'hui identifiées mais dont l'agencement final reste encore mal connu.

1.2. Epidémiologie

L'arthrite rhumatoïde, C'est la plus fréquente des maladies rhumatismales chroniques inflammatoires de l'adulte. Les études épidémiologiques sont soumises à de nombreuses difficultés méthodologiques tels que, l'AR est une affection hétérogène, il n'y a pas de test biologique ou radiographique suffisamment sensible et spécifique pour affirmer le diagnostic

de l'AR à sa phase initiale (Benard, 2009). Il y a de grandes variations en fonction des pays et des ethnies (Saraux et al ., 2001). Ainsi, en Europe et en Amérique du Nord, la prévalence rapportée est de l'ordre de 0,8 % de la population adulte alors qu'elle est, en Asie, de 0,3 à 0,8 % , en Afrique, l'AR est particulièrement fréquente (3,3 %) mais ceci uniquement en milieu urbain (Guillemin *et al* ., 2005). de façon générale la prévalence de la maladie autour de 0.5 à 1%. Elle est entre trois à quatre fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme. (Emmanuel, 2009 ; Coffer, 2011). Cette différence de sexe s'atténue progressivement avec l'âge au-delà de 70 ans (Sany, 2005).

L'AR est 2 à 3 fois plus fréquente chez les parents de sujets atteints ; sa concordance chez les jumeaux monozygotes est de 15 à 30 % et, chez les jumeaux dizygotes de 5 à 10 % (Benard, 2009). La guérison est possible surtout au début de la maladie. Les détériorations radiologiques concernant 80% des patients, sont précoces et rapides au cours des 2 à 3 premières années d'évolution. L'handicap à long terme est sévère et l'espérance de vie des arthritiques est raccourcie (en moyenne réduite de 5 ans) (Mazières *et al.*, 1999).

1.3. Facteurs de risque

L'AR est une affection dont l'origine précise n'est pas connue (Klareskog *et al.*, 2009). Cependant on la classe comme une maladie auto-immune à cause de la présence des signes biologiques d'auto réactivité. Plusieurs facteurs favorisants ont été identifiés : tels que les facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux et les facteurs psychologiques et nutritionnels (Emmanuel, 2009).

1.3.1. Facteurs hormonaux

La plus grande incidence de l'AR chez la femme, avec un sexe-ratio de un homme pour quatre femmes, suggère une implication des hormones dans le déclenchement de l'AR. Les études épidémiologiques se sont intéressées à l'influence de la grossesse, de l'allaitement et des facteurs hormonaux endogènes ou exogènes comme facteurs de risques de l'AR. Pendant la grossesse, le risque de développer une AR est faible, tandis que dans l'année qui suit le post-partum ce risque est nettement plus élevé (Silman *et al.*, 1992). L'allaitement a été incriminé comme étant un facteur de risque, responsable de l'incidence plus élevée dans le post-partum. En effet, une étude portant sur 187 femmes qui avaient développé une AR après la première grossesse montre que celles qui avaient allaité leur enfant ont un risque cinq fois supérieur d'avoir une AR (Brennan et Silman, 1994). Cette implication des facteurs

hormonaux endogènes est soulignée par certaines études qui ont montré une hypoandrogénie relative chez les femmes mais aussi chez les hommes atteints de l'AR, avec des taux de testostérone et de déhydroépiandrostérone plus bas. Les hormones exogènes, que ce soit la pilule contraceptive ou le traitement hormonal substitutif, ne modifient pas l'incidence de la PR mais semblent retarder son début et sa sévérité (Cutolo *et al.*, 2002).

1.3.2. Facteurs génétiques

Le taux de concordance pour l'AR chez les jumeaux homozygotes atteints est en moyenne de 15 à 30%. L'association génétique la plus forte est observée avec les gènes codant pour les molécules '*human leukocyte antigen'* (HLA) de classe II qui sont surtout exprimées à la membrane des cellules présentant l'antigène (CPA). Ces molécules ont une structure dimérique composée de chaînes peptidiques a et b, avec un site de liaison pour les peptides antigéniques. L'AR est associée aux allèles HLA-DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0101. Les molécules HLA codées par ces allèles se caractérisent par une séquence commune d'acides aminés (QKRAA), située entre les positions 70 et 74 de la chaîne b et qui correspond également au site impliqué dans la reconnaissance antigénique (Gregersen *et al.*, 1987). Cette séquence commune, appelée aussi « épitope partagé », pourrait être au cœur de la réaction auto-immune médiée par les lymphocytes T. Trois principaux modèles ont été proposés :

• l'épitope partagé pourrait reconnaître un peptide du soi et favoriser dans le thymus la persistance d'un clone de lymphocytes T autoréactifs par sélection clonale positive; ce clone T autoréactif pourrait dans certaines conditions être activé et déclencher une réponse immunitaire spécifique contre ce peptide du soi ;

• l'épitope partagé se lierait spécifiquement avec l'antigène responsable de l'AR ; une étude récente a montré une affinité de l'épitope partagé pour les peptides citrullinés qui représentent un groupe de peptides candidats à l'initiation de l'AR (Hill *et al.*, 2003) ;

• l'épitope partagé interagirait avec un peptide antigénique exogène mais ayant une structure voisine à un peptide du soi. Cette théorie dite du « mimétisme moléculaire » a été observée pour une glycoprotéine du virus Epstein-Barr (la gp110), mais aussi pour la protéine ADN-J d'*Escherichia coli* et les protéines de choc thermique (*heat schock proteins* : HSP).

L'implication des allèles HLA-DRB1*04 et DRB1*01 dans l'AR est également soulignée par l'association étroite entre ces allèles et la sévérité de la maladie. Prés de 90% des patients

atteints de l'AR sont porteurs des Ag HLA DR4 (60%) ou DR1 (30%). L'allèle DRB1*04 est pratiquement constamment retrouvé dans les AR agressives, avec des dégradations ostéoarticulaires plus précoces (Emery *et al.*, 1992 ; Gough *et al.*, 1994) et plus importantes (Weyand *et al.*, 1995 ; Combe *et al.*, 1995). L'allèle HLA-DRB1*01 semble également associé aux AR sévères, mais plus faiblement. Le nombre d'allèles à risque dans le génotype du patient est corrélé avec la sévérité de l'AR. La notion dose d'effet a été développée par les travaux de Weyand *et al.*, (1995) qui montrent que les patients homozygotes pour DRB1*04 ont un risque de développer une AR plus sévère que les sujets hétérozygotes pour cet allèle. D'autres polymorphismes génétiques ont été décrits pour des gènes impliqués dans la présentation antigénique comme HLA (DM), (Pinet, 1997) ou le récepteur FCcRIII des immunoglobulines, (Nieto *et al.*, 2000) mais aussi pour des gènes codant pour des cytokines comme le *tumor necrosis factor* (TNFα), les interleukines (IL) 1b, 4 et 10. (Buchs *et al.*, 2000 ; Buchs *et al.*, 2001 ; Udalova *et al.*, 2002 ; Lard *et al.*, 2003) Ces polymorphismes génétiques représentent des facteurs pronostiques de sévérité. Ainsi, le polymorphisme du gène codant pour l'IL1b est associé à des AR plus érosives tandis que le polymorphisme du gène codant pour l'IL4 est associé à des AR moins destructrices (Buchs *et al.*, 2000, 2001)

1.3.3. Facteurs environnementaux

Les agents infectieux viraux (Epstein-Barr), bactériens (*E. coli*) et mycobactériens ont été incriminés dans le déclenchement de l'AR. Une infection commune sur un terrain génétiquement prédisposé pourrait déclencher la maladie par mimétisme moléculaire de certains composants de ces agents infectieux avec des composants de l'articulation. La protéine de choc thermique HSP65 a une structure voisine avec une protéine présente dans le cytoplasme des cellules de la couche bordante. L'HSP70 d'*E. coli* est reconnue par l'épitope partagé de la molécule HLA-DR. Les souris immunisées avec *Mycobacterium tuberculosis* produisent des anticorps dirigés contre les HSP. Une réaction immunitaire croisée pourrait donc déclencher la réaction inflammatoire observée dans l'AR. Les agents infectieux peuvent induire une réponse immunitaire innée par activation des '*toll like receptors*' (TLR) (Klinman, 2003). Ces TLR reconnaissent des molécules exprimées par les micro-organismes : TLR4 est activée par les composants lipopolysaccharidiques de la membrane bactérienne et TLR9 interagit avec l'oligonucléotide CpG présent dans l'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien. D'autres facteurs environnementaux, comme le statut social, la vie urbaine par

rapport au mode de vie rural, le régime alimentaire, ont été incriminés dans le déclenchement de l'AR (Silman *et al.*, 1996).

1.3.4. Tabagisme

Le tabagisme est connu pour être associé à la production de facteurs rhumatoïdes (FR), ce qui permet de conclure que le tabagisme augmente le risque de développer une AR. En effet plusieurs études ont souligné le lien potentiel entre l'intoxication tabagique et l'existence d'un FR conforté par la corrélation entre le FR et les taux sériques de thiocyanates et de nicotine mais sans que cela soit formellement prouvé (Saville *et al.*, 2003). En revanche, deux études longitudinales confirmées par une étude sur les jumeaux ont montré un risque plus élevé de développer une AR chez les fumeurs de tabac (Silman *et al.*, 1996).

1.3.5. Les facteurs nutritionnels

Ils ont fait l'objet de nombreuses études qui ont montré que le risque de l'AR était multiplié par trois chez les gros consommateurs de protéines par comparaison aux faibles consommateurs, les apports en vitamine D étaient faiblement associés à ce risque. La fréquence de l'AR est plus faible dans les pays asiatiques ou méditerranéens ou la consommation est moindre de viande rouge, un régime de type méditerranéen (riche en fruits et en légumes, pauvre en viande rouge) améliore les symptômes de la maladie, ainsi une augmentation élevée de viande rouge augmente le risque de l'AR. C'est pourquoi il est recommandé de conseiller aux patients atteints de l'AR une diminution de leurs apports en viande rouge ne serait-ce-que pour diminuer la morbidité cardio-vasculaire qui est augmenté chez les arthritiques (Rivera *et al.*, 2001).

1.4. Mécanismes physiopathologiques

Les mécanismes immuno-pathologiques impliqués dans l'AR évoluent chronologiquement en trois phases distinctes : une phase d'initiation de la réponse immunitaire avec les différents facteurs responsables de l'initiation de l'AR, une phase d'inflammation de l'articulation dont la pathogénie est mieux connue et une phase de destruction du cartilage et de l'os (Figure 1).

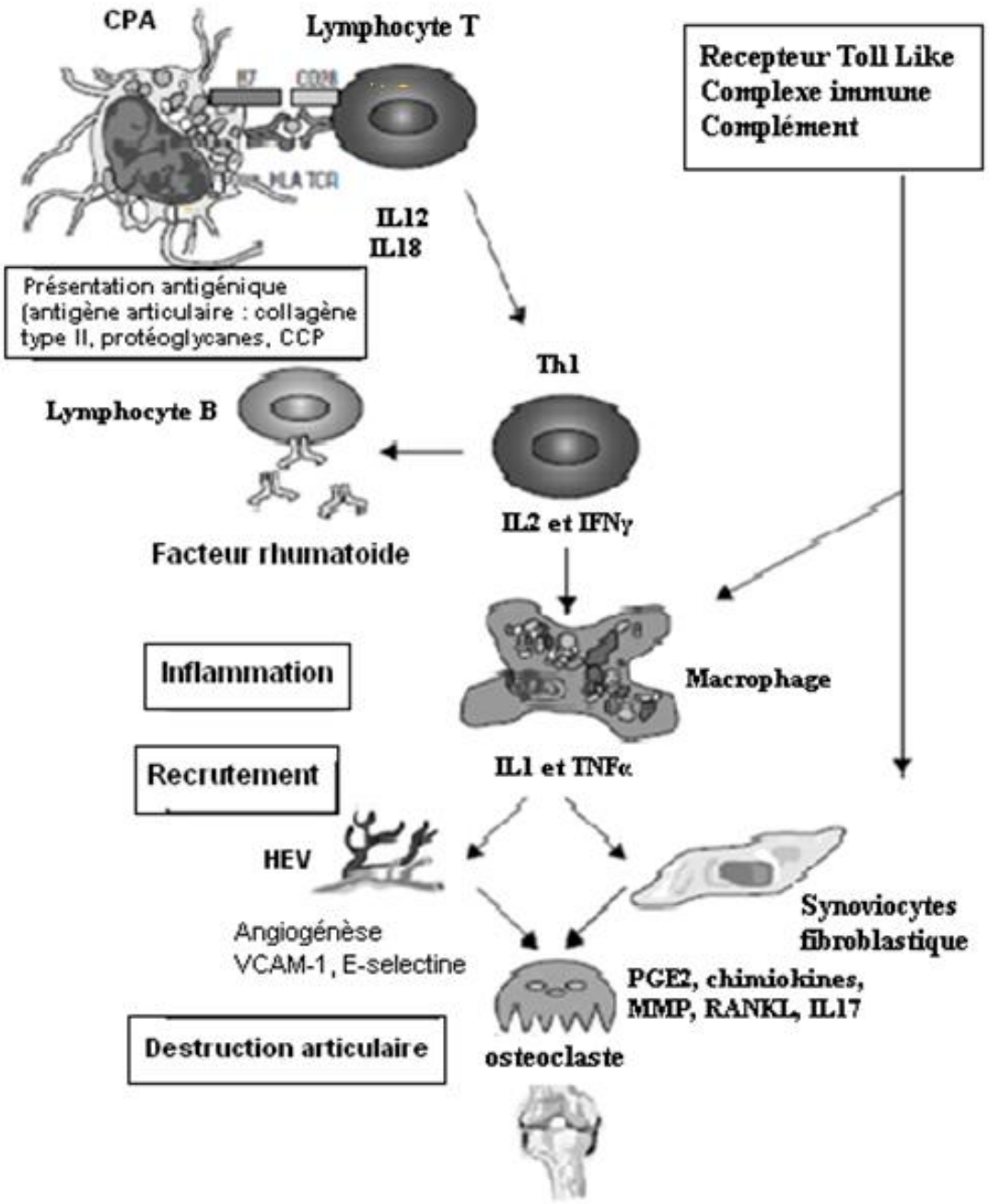


Figure. 1 : Différentes phases de la physiopathologie de la l'arthrite rhumatoïde (AR) (Morel *et al.*, 2004). HLA : human leukocyte antigen, IL : interleukine; IFN : interféron, TNF : tumor necrosis factor, HEV : high endothelial veinule (veinule postcapillaire), VCAM : vascular cell adhesion molecule, PG : prostaglandine, MMP : métalloprotéinases, TCR : T cell receptor, RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa B ligand.

1.4.1. Initiation de la réponse immunitaire

Le point de départ de la réponse immunitaire au cours de l'AR reste mal défini. L'hypothèse d'une initiation de l'activation de l'immunité innée et adaptative en périphérie (en dehors de l'articulation) est admise. Sous l'action de facteurs de l'environnement tels que le tabac, les poussières de silice, de charbon de bois et les infections, les macrophages pulmonaires s'activent et entraînent l'apoptose de quelques cellules avoisinantes ainsi que l'activation de la peptidylarginine déiminase (PAD). Cette enzyme génère des néoantigènes à partir d'auto-antigènes en opérant des modifications post transcriptionnelles des protéines qui consistent à changer leurs résidus arginine en citrulline. Ces protéines citrullinées, reconnues comme non soi, sont captées par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Leur apprêtement et leur présentation aux lymphocytes sont facilités par la présence d'un épitope partagé au niveau de la chaîne β des molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Cet épitope est une séquence d'acides aminés (Gln- Lys-Arg-Ala-Ala ou Gln- Arg -Arg-Ala-Ala ou Arg - Arg -Arg-Ala-Ala) codée par un des allèles HLA de susceptibilité spécifiques de l'AR (HLA DRB1*0401, HLA DRB1*0404, HLA-DRB1*0101, DRB1*1402), (Dubucquoi et Fily-Nalewack, 2008 ; Atouf *et al.*, 2008).

La CPA, devenue mature, active les lymphocytes T et B, entraînant la synthèse des anticorps anti-CCP (citrulline cyclic peptide) et du facteur rhumatoïde. Ceci explique la présence de ces anticorps très tôt au cours de l'évolution de la maladie avant même les signes cliniques et permet un diagnostic précoce. Les anti-CCP circulent et vont se localiser au niveau de l'articulation où ils contribuent au déclenchement de l'inflammation (Klareskog *et al.*, 2009).

1.4.2. Développement de l'inflammation dans l'articulation

1.4.2.1. Initiation de l'inflammation

Sous l'influence de facteurs de l'environnement (ultraviolets, médicaments, traumatismes et dérivés de l'oxygène (reactive oxygen species : ROS), certains auto-antigènes (collagène de type II, glycoprotéine 39 (GP39) du cartilage, immunoglobulines G (IgG), fibrine subissent une modification post transcriptionnelle et deviennent des néoantigènes (Kitamoto *et al.*, 2008; Griffiths *et al.*, 2008; Okumura *et al.*, 2009). Les anti-CCP, formés en périphérie, qui ont migré dans l'articulation, reconnaissent et se lient à ces néoantigènes par mimétisme formant des complexes immuns (Sebbag *et al.*, 2004). Ces derniers, dont le

fragment Fc de l'Ig est libre, se fixent sur le récepteur du fragment Fc des macrophages synoviaux et des polynucléaires neutrophiles (PNN). L'activation de ces cellules induit une transduction des signaux à travers un ensemble de tyrosines kinases (notamment Syk) et une sécrétion de cytokines (tumor necrosis factor α :TNFα, interleukine 1 et 6), de chimioattractants et de métalloprotéinases (MMPs). Ces cytokines stimulent l'angiogenèse (Avouac *et al.*, 2008 ; Szekanecz *et al.*, 2009) et augmentent l'expression des molécules d'adhérence cellulaire (CAM) au niveau de l'endothélium vasculaire. Ceci permet le recrutement des cellules immunitaires au niveau du site inflammatoire avec la formation de panus synovial : cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes T et B (Figure 2), (Falgarone *et al.*, 2005 ; Pratt *et al.*, 2009).

1.4.2.2. Activation des cellules de l'immunité innée

Les cellules dendritiques, les macrophages et les synoviocytes sont activés par l'intermédiaire des récepteurs de l'immunité innée et des TLR qu'ils portent à leur surface (Tran *et al.*, 2005). L'activation de ces TLR, dans l'AR, est déclenchée par la liaison avec leurs ligands endogènes appelés «damage-associated molecular patterns» ou DAMPs comme la protéine du choc thermique (HSP), l'ADN et l'ARN. Les DAMPs sont générés par un stress oxydatif qui résulte d'une rupture de l'équilibre entre la production des ROS et leur élimination par les antioxydants comme la superoxyde dismutase (SOD), (Champy *et al.*, 2007). La liaison des TLR aux DAMPs entraîne une transduction du signal médiée par quatre protéines adaptatrices, relayées ensuite par plusieurs kinases (initiales et distales) et par trois facteurs de transcription : le «nuclear factor κB» (NF-κB), l'«activator protein 1» (AP1) et l' «interferon regulatory factor » (IRF). Ces facteurs de transcription induisent la synthèse des interférons (IFN), du TNFα, des interleukines 1, 6, 10, 12 et de différentes chimiokines par les cellules dendritiques. L'activation des synoviocytes *via* leur TLR, aboutit à la synthèse de l'IL1, de l'IL6, de la prostaglandine PGE2 et des MMPs alors que l'activation des macrophages conduit à la production de l'IL1, l'IL6 et le TNFα (Brentano *et al.*, 2005 ; Essakalli *et al.*, 2008).

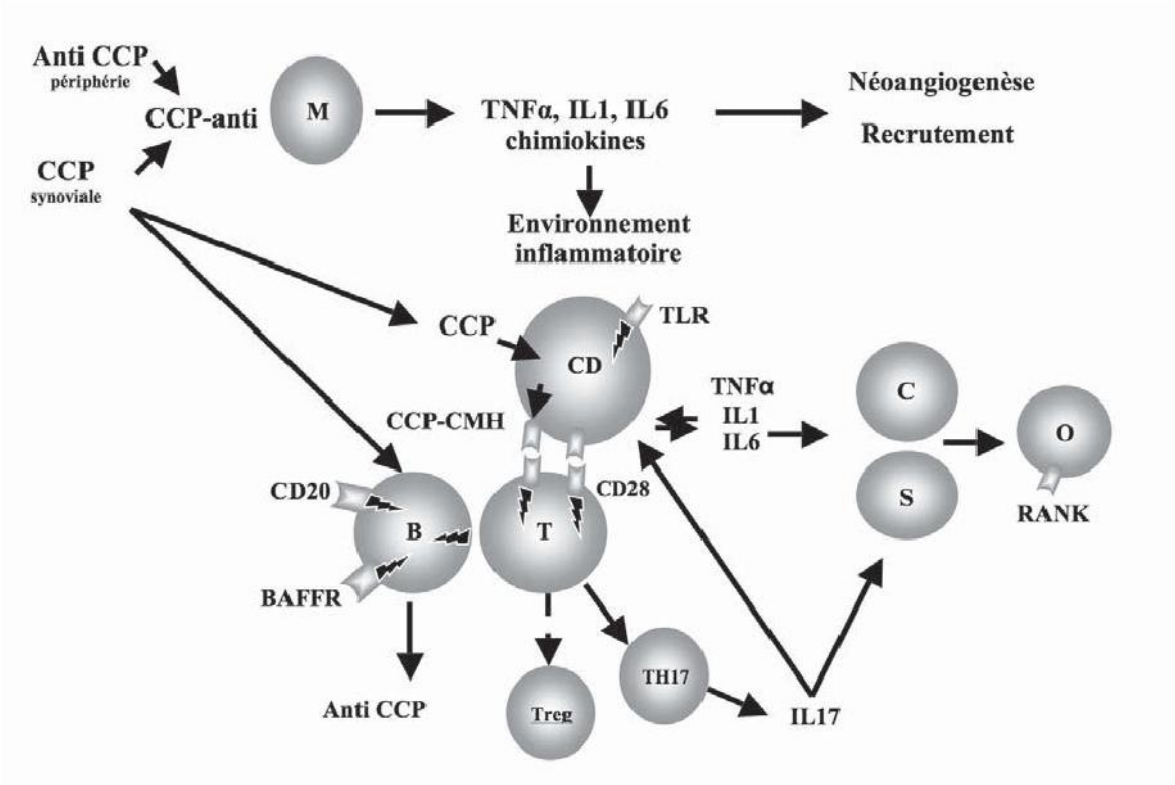


Figure 2 : Rôle de la protéine cyclique citrullinée dans le déclenchement de la maladie (Essakallia *et al*., 2011). CCP : protéine cyclique citrullinée, M : macrophage, CD : cellule dendritique, T : lymphocyte T, TH17 : lymphocyte T helper 17, Treg : lymphocyte T régulateur, B : lymphocyte B, C : chondrocyte, S: ynoviocyte, O : ostéoclaste, TNF : tumor necrosis factor, IL : interleukine, TLR : toll like receptor, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, BAFFR : récepteur du B-cell activation factor, RANK : receptor activator of NF-Kb

1.4.3. Phase de destruction articulaire

Des progrès considérables ont été réalisés pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la destruction ostéoarticulaire qu'est la conséquence de la prolifération pseudotumorale de la synoviale et de l'action des cytokines. La nette réduction des destructions articulaires chez les patients traités par des antagonistes de l'IL1 et du TNFα démontrent clairement le rôle de ces cytokines dans la maladie (Jiang *et al.*, 2000 ; Lipsky *et al.*, 2000 ; Genovese *et al.*, 2002). L'IL1 et le TNFα participent à cette destruction articulaire en induisant non seulement la synthèse de facteurs de croissance nécessaires à la prolifération de la synoviale, mais aussi la production par les synoviocytes de métalloprotéinases, de cathepsines et de collagénases responsables de la dégradation des principaux composants du cartilage (Okada *et al.*, 1989 ; Case *et al.*, 1990 ; Edwards, 2000 ; Feldmann et Maini, 2001). Des études suggèrent l'implication du système RANK/RANKL dans la résorption osseuse sous chondrale des patients atteints de l'AR. Le RANKL est une nouvelle cytokine qui se fixe sur la surface des cellules de la lignée ostéoblastique, des lymphocytes activés et des cellules endothéliales (Hofbauer *et al.*, 2000 ; Roux et Orcel, 2000 ; Collin-Osdoby *et al.*, 2001). La production du RANKL est régulée par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1, le TNFα, (Hofbauer *et al.*, 1999) et l'IL17. RANK est le récepteur membranaire de RANKL et l'ostéoprotégérine la forme soluble du récepteur. La liaison de RANKL à son récepteur membranaire RANK, présent sur les préostéoclastes, favorise la différenciation et l'activation des ostéoclastes (Hofbauer et Heufelder, 2001) RANKL est trouvé à des concentrations élevées dans le sérum et le liquide synovial des patients atteints de l'AR. Le rôle de RANKL dans la destruction articulaire est fortement suggéré par les observations faites dans les modèles animaux.

Dans le modèle de l'arthrite induite par le transfert de sérum provenant de souris K/BxN appliqué aux souris déficientes en RANKL (RANKL -/-), les souris développent une arthrite mais pas d'érosions osseuses (Pettit *et al.*, 2001). Dans différents modèles d'arthrites expérimentales, l'administration d'ostéoprotégérine réduit les érosions osseuses et augmente la densité minérale osseuse (Redlich *et al.*, 2002). Les synoviocytes et les cellules endothéliales pourraient participer à la destruction articulaire par l'intermédiaire de ce système par leur capacité à exprimer du RANKL lorsqu'elles sont stimulées (Collin-Osdoby *et al.*, 2001 ; Takayanagi *et al.*, 2000). Les phénomènes d'apoptose sont en effet rares dans la synoviale et pourraient résulter d'une surexpression de facteurs antiapoptotiques. L'apoptose

induite par le système Fas/FasL ne concerne qu'un pourcentage limité de synoviocytes (20 %) et la majorité des cellules sont résistantes à l'apoptose. Cette résistance des synoviocytes pourrait donc résulter d'une surexpression de facteurs antiapoptotiques qui restent à identifier. Les synoviocytes obtenus à partir de patients atteints de l'AR se distinguent de ceux des sujets normaux ou arthrosiques par leur capacité à adhérer fortement au cartilage, à l'envahir et enfin à le détruire (Edwards, 2000).

1.5. Les signes cliniques

L'AR est un rhumatisme inflammatoire chronique polysynovial, qui conduit plus au moins rapidement à la destruction cartilagineuse et osseuse et à terme, à l'incapacité fonctionnelle. Il réalise ainsi une atteinte acromélique à tendance symétrique évoluant par poussées permettant de décrire des formes de début, des formes avérées et des formes anciennes et séquellaires (Thomas *et al.*, 2006).

1.5.1. Arthrite rhumatoïde au début

1.5.1.1. Signes cliniques

La phase de début de l'AR est de durée variable: quelques mois à un an ou même plus (Sany, 2003). L'affection se présente initialement comme une inflammation articulaire intéressant un petit nombre d'articulations: les poignets, une ou plusieurs articulations métacarpo-phalangiennes ou interphalangiennes, parfois les avant-pieds. Ces signes d'abord locaux (douleur, enraidissement) sont très marqués le matin et s'atténuent peu à peu dans la journée. Ils réapparaissent le soir et pendant la nuit. A cette phase de la maladie on n'observe pas de déformation articulaire. Il n'y a que très peu de signes généraux: discrète fièvre, modeste altération de l'état général. Au cours de l'AR, les lésions articulaires destructrices sont le plus souvent symétriques. La symétrie est habituellement considérée comme un signe caractéristique de la maladie (Van Gaelen, 2005).

1.5.1.2. Signes radiologiques

Les radiographies ne peuvent être une aide au diagnostic précoce de l'AR, que si les destructions surviennent tôt dans la maladie. Les érosions sur les radiographies des mains et des avant-pieds semblent être le critère le plus fiable, la déminéralisation osseuse périarticulaires se traduisant par une hyper transparence osseuse autour des articulations,

signe non spécifique présent dans l'ensemble des rhumatismes inflammatoires. Il existe un épaississement des parties molles périarticulaires (Combe, 2007).

1.5.1.3. Signes biologiques

C'est à ce stade de début que le bilan biologique est le plus important. Son but est de :

- Confirmer un diagnostic de l'AR, déjà évoqué sur les données de l'examen clinique.
- Eliminer d'autres étiologies de rhumatisme inflammatoire.
- Evaluer l'évolutivité et rechercher des éléments du pronostic.

Au début, il existe, dans 80% des cas, un syndrome inflammatoire non spécifique. Les FR peuvent être présents de façon précoce :

- Accélération de la Vitesse de sédimentation.
- Elévation de la CRP.
- Liquide articulaire inflammatoire (2000 élements/mm^3 avec prédominance de polynucléaires), (Batteux et Weill, 2003).

Le facteur rhumatoïde est un autoanticorps, en majorité de classe IgM qui se lie spécifiquement à des épitopes de la région Fc des IgG. Sa détection se fait par les réactions d'agglutinations de Waler-Rose et le test au latex. Les taux de facteur rhumatoïde sont très élevés dans certaines maladies auto-immunes comme l'AR (Reveillard, 2001). Les anticorps anti-cytokératine ou anti-filaggrine sont dirigés contre une citrulline, moins sensibles (40-50% des cas) mais plus spécifiques (95%), leur présence est aussi un facteur de sévérité.

1.5.2. Arthrite rhumatoïde au stade avéré

1.5.2.1. Signes cliniques

Les poussés successives accentuent l'atteinte articulaire entrainant déjà des déformations caractéristiques ainsi que des lésions cartilagineuses irréversibles. Lorsque l'inflammation régresse, les articulations peuvent devenir instables et se déformer sous l'action des muscles ce qui aboutit parfois à des déviations articulaires. La main par exemple prend un aspect en "dos de chameau", les doigts sont fréquemment déformés, ils deviennent tous vers l'intérieur (coup de vent cubital). On note des modifications morphologiques des doigts " en col de cygne", doigt en M ou Z (Caron, 2007), (Figure. 3). Les douleurs ont un rythme dit inflammatoire avec un dérouillage matinal supérieur à 30 min et des exacerbations nocturnes.

L'affection évolue sur un mode chronique avec des périodes de poussées au cours desquelles l'ensemble des articulations ont tendance à gonfler et à s'enraidir. Ces phases durent quelques semaines. C'est le stade où co-existent des signes inflammatoires (arthrites et ténosynovites) et des déformations articulaires. Les mains sont touchées dans 90% des cas.

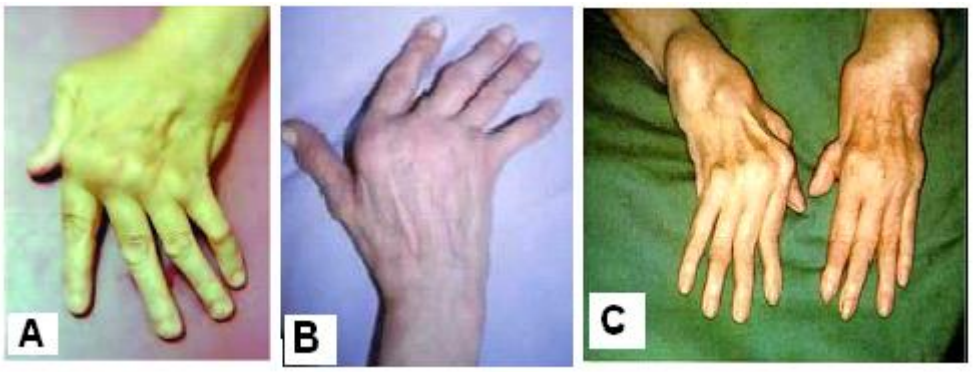


Figure 3: Déformations caractéristiques des mains au cours de l'AR. A) Déviation du « pouce en Z », B) synovite des MCP avec subluxation et déviation en coup de vent cubital des doigts ; C) des doigts « en maillet » M (Combe, 2007).

1.5.2.2. Signes radiologiques

C'est à ce stade que les signes radiologiques sont les plus caractéristiques (Figure. 4). Ils associent :

- Une déminéralisation osseuse épiphysaire.
- Un pincement articulaire global (par atteinte globale du cartilage)
- Des érosions osseuses et des géodes sous-chondrales (à la jonction de la membrane synoviale et de l'os par action destructrice du pannus rhumatoïde).
- Des déformations articulaires (subluxation et luxation) par atteinte ténosynoviale.

A un stade avancé de destruction, il y a disparition de l'interligne articulaire, l'évolution pouvant se faire vers la synostose (carpite fusionnante, tarsite fusionnante).

1.5.2.3. Signes biologiques

En l'absence de traitement, le syndrome inflammatoire tend à s'intensifier, mais il existe des périodes de rémission spontanée. Les autoanticorps restent inchangés. Il est inutile de

multiplier les prescriptions de facteurs rhumatoïdes, d'anticorps anti-nucléaires et d'anticorps anti-filaggrine (Batteux et Weill, 2003).

Figure 4: Signes radiologiques articulaires caractéristiques de l'AR (Bonnevialle *et al.*, 2001).

1. érosions rhumatoïdes caractéristiques des mains traduisant l'agressivité de la synovite rhumatoïde. A) Atteintes rhumatoïdes du carpe. B) Atteintes rhumatoïdes des doigts**.**

2. Stades radiographiques du coude rhumatoïde. C) correspond à une synovite avec une radiographie normale. D) des modifications architecturales modérées avec pincement global de l'interligne et l'existence de géodes intraosseuses. E) des

modifications architecturales sévères avec destruction du capital osseux et instabilité du coude par distension ligamentaire.

1.5.2.4. Signes histologiques

C'est à ce stade que la synovite rhumatoïde est histologiquement caractéristique avec une multiplication des cellules bordantes (synoviocytes), des dépôts de fibrine en surface, une nécrose fibrinoïde en profondeur. Des infiltrats lympho-plasmocytaires prenant une organisation nodulaire, à la manière d'un organe lymphoïde. Le manque de spécificité de ces signes ne permet malheureusement pas de faire de l'examen histologique un élément diagnostique certain.

1.5.3. L'arthrite rhumatoïde au stade séculaire

C'est le devenir de la maladie après plusieurs années d'évolution. Les signes cliniques associent des douleurs inflammatoires et des douleurs mécaniques, secondaires à la destruction articulaire. Les synovites sont plus rares. Le syndrome biologique inflammatoire est souvent réduit, voir absent. L'AR est éteinte, les signes histologiques synoviaux perdent leurs caractéristiques : la synoviale devient fibreuse, l'infiltrat lympho-plasmocytaire est minime ou absent. L'histologie n'est plus évocatrice de la maladie rhumatoïde.

1.5.4. Les manifestations extra-articulaires

Les manifestations extra-articulaires de l'AR traduisent le caractère systémique de la maladie qui peut toucher de nombreux tissus (Combe, 2007). Elles s'observent surtout au cours des polyarthrites séropositives et érosives (Eyquem *et al.*, 2000) et touchent plusieurs localisations: les poumons, les yeux, le système nerveux (Weill et Batteux, 2003), le cœur, le muscle, les reins et l'os (Combe, 2007). Parmi les signes généraux on note : fébricule, asthénie, anorexie (Will et Batteux, 2003) et amaigrissement très fréquent (Zagury et Bruyère, 1998).

1.5.4.1. Les nodules rhumatoïdes

Les nodules rhumatoïdes (NR) constituent les manifestations extra-articulaires les plus fréquentes et s'observent chez 10 à 30% des patients atteints de l'AR. Ils se développent après quelques années d'évolution du rhumatisme (Bessis, 2007). Ils siègent essentiellement à la

face postérieure de l'avant-bras, du coude (Cotten *et al.*, 2005) et aux doigts (Eyquem *et al.*, 2000). Ce sont des tuméfactions sous-cutanées mobiles ou plus rarement adhérentes uniques arrondies ou polylobées (Figure 5). Les nodules rhumatoïdes sont très caractéristiques de l'AR. Ils peuvent se voir au cours d'autres connectivites et même de façon isolée, en l'absence de toute autre maladie (Thomas *et al.*, 2006).

Figure 5: Nodules rhumatoïdes. A : au niveau de l'avant-bras, B : au niveau de la poignée et les doits (Combe, 2007).

1.5.4.2. Les manifestations pleuro-pulmonaires

Les manifestations pulmonaires les plus communes de l'AR sont la pleurésie rhumatoïde et la fibrose interstitielle diffuse (Sany, 2003). La pleurésie représente la manifestation pulmonaire la plus fréquente : 5 à 20% des cas. En outre, des lésions très similaires aux nodules rhumatoïdes sous-cutanés dans les poumons et sur les surfaces pleurales peuvent se développer. Des infections pleuro-pulmonaires sont particulièrement fréquentes sur ce terrain, favorisées par le traitement de fond et la corticothérapie (Combe, 2007). La pleurésie exsudative est souvent unilatérale. L'épanchement est rarement très abondant, se manifestant par une douleur thoracique latérale basse, une toux et une dyspnée. L'épanchement est jaune clair, riche en FR, pauvre en glucose. La cellularité est variable, souvent entre 1000 à 5000 cellules par mm^3 (polynucléaires et lymphocytes). Elle

guérit le plus souvent en moins de trois mois, spontanément ou sous l'effet d'un traitement corticoïde.

La radiographie montre des opacités réticulo-nodulaires. Les épreuves fonctionnelles respiratoires permettent le suivi de cette fibrose. Elles témoignent d'un syndrome restrictif avec diminution de la diffusion de l'oxyde de carbone. Le lavage broncho-alvéolaire montre une augmentation des cellules : polynucléaires et lymphocytes (Mazières *et al.*, 1999). La fibrose pulmonaire complique surtout l'AR masculines et son pronostic est souvent sévère. Des nodules rhumatoïdes peuvent être découverts à la radio dans le parenchyme pulmonaire. Les difficultés diagnostiques avec une pathologie tumorale ou tuberculeuse justifient parfois la réalisation d'une biopsie. Ces nodules sont plus fréquents au cours des AR masculines FR positives. Associés à une silicose, ils définissent le syndrome de Caplan-Colinet (Mazières *et al.*, 1999).

1.5.4.3. Les manifestations cardiaques

Les manifestations cardiaques peuvent intéresser les trois tuniques, plus fréquemment le péricarde (Sany, 2003). Cependant, il peut exister des lésions valvulaires et myocardiques. Elles peuvent s'observer surtout dans les AR anciennes, érosives et nodulaires (Thomas *et al.*, 2006).

1.5.4.4. Vascularite rhumatoïde

La vascularite rhumatoïde constitue une manifestation rare (1%), mais potentiellement grave de l'AR. Elle se développe en moyenne 10 à 17 ans après la survenue de l'atteinte (Bessis, 2007). Les lésions touchent surtout les artérioles et les artères de petit calibre **(**Eyquem *et al.*, 2000). L'atteinte de l'aorte est rare mais non exceptionnelle, mise en évidence dans 5% des cas d'une série autopsique de sujets porteurs de l'AR. L'atteinte peut toucher d'autres territoires que l'aorte : les artères pulmonaires et les coronaires (Doffoel-Hantz *et al.*, 2005).

1.6. Biologie de l'arthrite rhumatoïde

1.6.1. Liquide synovial

L'étude du liquide synovial prélevé sur une articulation inflammatoire peut être intéressante au cours de l'AR. Ce liquide est de type inflammatoire, riche en

polymorphonucléaires (PMN). Le complément articulaire est bas même lorsque celui sérique est normal (Combe *et al.*, 2007).

1.6.2. Le facteur rhumatoïde

Les FR sont des autoanticorps le plus souvent de type IgM, ayant une activité anticorps dirigée contre les IgG humaines ou animales. Les FR ne sont pas spécifiques de la maladie, ils sont présents dans le sérum de 80% des patients ayant une AR. Ils sont généralement absents au début de la maladie et peuvent aussi apparaître au cours de certaines maladies infectieuses ou inflammatoires. Ils sont mis en évidence par réaction de Waaler-Rose (positivité au-delà de 1/30) ou réaction de Latex (positivité au-delà de 1/80). D'autres tests ont été développés pour aider à diagnostiquer l'AR. En effet le test ELISA permettant d'identifier les isotypes du FR semble être une technique plus sensible et plus reproductible que les tests d'agglutination (Reveillard, 2001).

1.6.3. Les anticorps anti-filaggrine

Décrits plus récemment, les anticorps anti-filaggrine, les Ac antikératine(AKA) et anti-périnucléaire (APN), constituent des marqueurs biologiques de l'AR plus spécifiques que le FR et peuvent être présents à un stade précoce de la maladie. Des tests de détection des Ac anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP) de la filaggrine, ont été développés par ELISA, et ont présenté une sensibilité supérieure à celle des AKA avec une performance voisine de celle des APN (Dubous *et al.*, 2005). Il existe deux types d'Ac anti-CCP : anti-CCP1 et anti-CCP2. Les anti-CCP ont une sensibilité de 68% et une spécificité de 98% pour les AR tout-venant, mais chez les malades atteints d'arthrites récentes, la sensibilité varie de 40 à 66%, leur spécificité serait de 96% dans les AR récentes avec une légère supériorité des anti-CCP2 (Nicaise *et al.*, 2003). Ces auteurs concluent sur l'intérêt de l'association des anti-CCP à des symptômes cliniques comme l'existence de douleurs polyarticulaires ou la notion de dérouillage matinal. Ces éléments sont susceptibles d'identifier les sujets développant une arthrite débutante et devant ainsi faire l'objet d'une prise en charge rhumatologique spécialisée rapide (Van Gaelen *et al.*, 2005).

1.7. Traitement de l'arthrite rhumatoïde

Trois grandes classes de médicaments sont actuellement disponibles pour le traitement de l'AR : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les corticostéroïdes et les

traitements de fond encore appelés médicaments anti-rhumatique modifiant la maladie (*disease modifying anti-rheumatic drugs :* DMARD). Le traitement de la maladie rhumatoïde nécessite l'utilisation conjointe d'un traitement de fond et d'un traitement symptomatique permettant d'atteindre la pleine efficacité du traitement de fond. La thérapeutique vise à améliorer la symptomatologie douloureuse, à lutter contre l'inflammation articulaire et systémique et à préserver la meilleure fonction articulaire possible.

1.7.1. Traitement symptomatique

1.7.1.1. Les Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les AINS sont les agents analgésiques utilisés en première ligne afin d'alléger la douleur, la raideur et le gonflement articulaire. Ils sont généralement prescrits en première intention au cours des premières semaines d'évolution d'une AR, avant l'établissement du diagnostic, mais ces médicaments utilisés seuls n'empêchent pas la progression clinique ni structurale de la maladie, et leur emploi est recommandé en association avec un traitement de fond (Jacobs, 1992). Les AINS inhibiteurs de la cyclo-oxygénase 2 (coxibs) (le célécoxib) ont une efficacité comparable aux AINS classiques et l'avantage d'une moindre toxicité gastrointestinale (ACRAG, 2002).

Les risques observés aux cours du traitement par les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont : des complications gastro-intestinales (ulcère gastroduodénal, hémorragies, perforations) et rénales (rétention hydrosodée, insuffisance rénale aiguë) impose une vigilance particulière et souvent une protection gastrique par des inhibiteurs de la pompe à protons. L'emploi des AINS inhibiteurs de la cyclo-oxygénase 2 est limité par un risque cardiovasculaire accru en utilisation prolongée, ce médicament est contre-indiqué chez les patients aux antécédents d'accidents cardiovasculaires (Jacobs, 1992).

1.7.1.2. Les corticostéroïdes

La corticothérapie générale (prednisone, prednisolone) est un puissant anti-inflammatoire, très souvent prescrit au cours des AR débutantes ou avérées et dont l'efficacité à court terme sur les signes inflammatoires est démontrée (Olsen et Stein, 2004). L'intérêt de la corticothérapie pour prévenir et retarder les destructions articulaires de l'AR reste controversé, certaines études ne montrant aucun bénéfice structural (Capell *et al.*, 2004), alors que des études plus récentes apportent des arguments statistiques en faveur de l'efficacité

structurale de la corticothérapie à faible dose au cours des AR débutantes, en association avec les traitements de fond (Svensson *et al.*, 2005; Kirwan, 2007).

L'emploi des corticostéroïdes est limité par les effets indésirables bien connus de toute corticothérapie prolongée : fragilité cutanée, rétention hydrosodée et hypertension artérielle, susceptibilité aux infections, troubles psychiques, ostéoporose, ostéonécrose aseptique, myopathie proximale, diabète et cataracte (Olsen et Stein, 2004).

1.7.2. Traitement de fond

Le traitement de fond encore appelé '*disease modifying anti-rheumatic drugs*' (DMARD). Il existe deux groupes de DMARD : les traitements de fond conventionnels (*synthetic* DMARD) et les biothérapies (*biologic* DMARD).

1.7.2.1. Traitements de fond classiques

Les traitements de fond sont efficaces sur les signes cliniques et biologiques de la maladie et certains apparaissent capables de retarder voire de stopper la progression des signes radiologiques. Ils sont capables dans certains cas de conduire à la mise en rémission. Un traitement de fond est prescrit pendant toute la période où il apparaît à la fois efficace et parfaitement toléré. Certains traitements sont ainsi prescrits pendant parfois plus de 10 ans, ils ne sont cependant actifs qu'après plusieurs semaines ou quelques mois de traitement et leur efficacité ne sera pas jugée en règle avant 3 à 6 mois d'un traitement bien conduit et à des posologies correctes. La durée de prescription dépend de ce que l'on appelle le rapport bénéfice/risque.

a. Le méthotrexate

Le méthotrexate (MTX) est l'agent de rémission le plus utilisé depuis plus de 30 ans dans le traitement de l'AR compte tenu de son rapport efficacité/toxicité favorable. Il s'administre de façon hebdomadaire par voie orale ou parentérale (intramusculaire : IM, ou sous-cutanée : SC). Le traitement débute à une dose de 7.5 à 10 mg par semaine. Cette dose pourra être progressivement augmentée jusqu'à 20 à 25 mg par semaine selon la réponse clinique. Son délai d'action est de 4 à 8 semaines (Carli *et al.*, 2009). Le MTX est actuellement le premier traitement de fond recommandé devant toute AR débutante, associé

au début à la corticothérapie. Plusieurs études ont prouvé une efficacité supérieure de la voie injectable (SC ou IM) à la même posologie (Braun *et al.*, 2008).

Les effets secondaires potentiels du méthotréxate sont: nausées, céphalées, toxicité hématologique, hépatique, pulmonaire (pneumopathie et hypersensibilité), justifiant une surveillance régulière clinique, hématologique et des transaminases. Les patientes doivent être informées de la nécessité d'une contraception efficace compte tenu du risque tératogène (Jacobs, 1992).

b. Les antimalariques

L'hydroxychloroquine (HCQ), (Plaquénil®) est fréquemment utilisé puisqu'il présente un faible risque de toxicité (le risque de rétinopathie impose une surveillance ophtalmologique régulière). Ce traitement est utilisé au début de la maladie, souvent associé à d'autres traitements de fond. Son délai d'action est de 3 à 6 mois. La dose administrée est de 200 mg ne dépassant pas au total 6,5 mg/kg/j (Calguneri *et al.*, 1999).

c. Sulfasalazine

Sulfasalazine (SZP) ou Salazopyrine® présente un délai d'action de 1 à 2 mois. La dose de départ est de 500 mg par jour, augmentée de 500 mg par semaine jusqu'à une posologie maximale de 2 à 3g par 24 heures (Calguneri *et al.*, 1999).

d. Les sels d'or

Les sels d'or ont été utilisés depuis les années 1930, mais leur mauvais rapport bénéfice/risques (toxicité cutanée, hématologique et rénale) a conduit à un quasi-abandon de leur prescription de nos jours (Calguneri *et al.*, 1999). Cet agent est de plus en plus délaissé et se présente maintenant comme une alternative en cas d'échec ou d'une contre-indication aux autres agents de rémission (l'intoxication hépatique empêche l'administration de MTX).

e. Leflunomide (LEF) (Arava®) :

Leflunomide (LEF) ou Arava® est utilisé depuis 2000 à la posologie de 20 mg/j per os. La dose de charge est de 100 mg pour trois jours suivi d'une dose d'entretien de 10 à 20 mg par jour (Dayer et Cutolo, 2005). Les études ont confirmé qu'il avait une efficacité comparable à celle du MTX sur les symptômes et les signes de l'AR. Le LEF peut être utilisé en première

intention dans une AR débutante (Dayer et Cutolo, 2005) ou comme alternative au MTX, auquel il peut être éventuellement associé, à la condition d'une surveillance accrue des tests biologiques hépatiques. Il peut être associé aux diverses biothérapies, avec une efficacité comparable à celle du MTX (Finckh et Dehler, 2009). Des études menées par Calgueneri *et al.* (1993), et Mottonen *et al.* (2004), plaident en faveur de la supériorité de la multithérapie par rapport à la monothérapie. Ils ont montré aussi la nécessité d'un traitement précoce. Cependant, le grand intérêt de la multithérapie est de permettre un gain de temps, dans ce sens qu'en moins d'un an, les traitements de fond classiques ont été utilisés et en cas d'échec patent on peut rapidement envisager le passage aux nouveaux traitements, à savoir les anti-TNFα. Leflunomide est contre-indiqué en cas de grossesse, d'hépatopathie et d'insuffisance rénale chronique. Les patientes doivent être informées de la nécessité d'une contraception et des effets secondaires potentiels. Les troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée), la toxicité hépatique, l'hypertension artérielle, l'amaigrissement, la neuropathie périphérique, l'alopécie (Carli *et al*., 2009).

1.7.2.2. Nouveaux traitements

L'amélioration des connaissances de l'immunopathologie et la pathogénie de l'AR et le progrès de la biologie moléculaire ont ouvert de nouvelles possibilités thérapeutiques. A côté des traitements dits « de fond » anciennement connus, les études sont concentrées depuis quelques années sur les traitements immuno-modulateurs beaucoup plus sélectifs. Ils sont dirigés contre un médiateur biologique ou une cellule donnée. L'utilisation des nouveaux médicaments est appelée « biothérapie » ou parfois « drogues ciblées ». Parmi ces nouvelles approches prometteuses on trouve :

a. Les inhibiteurs des cytokines

- **Les inhibiteurs du TNFα**

Le traitement médicamenteux de l'AR a considérablement évolué ces dernières années. Après plus de dix ans de résultats décevants avec plusieurs agents biologiques, à la fin des années 1990, les inhibiteurs du TNFα (Mottonen *et al.*, 2002) ont modifié la prise en charge de l'AR. Ils se sont avérés remarquablement actifs sur l'activité de la maladie. Ils ont aussi montré leur capacité à freiner voire stopper l'atteinte structurale et, partant, à améliorer significativement la fonction articulaire et la qualité de vie.

En outre, grâce à un meilleur contrôle des phénomènes inflammatoires, il est souvent possible de réduire la posologie des glucocorticoïdes administrés au long cours. Ces médicaments sont capables de bloquer ou d'inactiver le TNFα, l'une des cytokines les plus impliquées dans la réponse inflammatoire et les destructions ostéoarticulaires. Trois médicaments sont actuellement commercialisés :

- L'infliximab

L'infliximab est un anticorps monoclonal chimérique (composé de la région Fab d'un Ac murin anti-TNFα et du Fc d'une IgG1 humaine). Il se lie spécifiquement et avec une forte affinité au TNFα circulant, neutralisant ainsi son activité biologique. Il s'administre par perfusion intraveineuse, sa demi-vie est de 10 jours (Furst *et al.*, 2004). Il est indiqué dans l'AR pour la réduction des symptômes et aussi pour l'amélioration des capacités fonctionnelles, chez les patients ayant une maladie active lorsque la réponse aux traitements de fond dont le MTX a été insuffisante (Le Loët *et al.*, 2005).

- L'adalimumab

L'adalimumab est le premier Ac monoclonal anti-TNFα totalement humanisé fabriqué par génie génétique en associant d'une part la partie variable des chaînes lourdes et légères d'origine humaine et d'autre part la partie constante d'une IgG1/κ humaine (Brousse, 2003). Il est indiqué pour le traitement de l'AR modérément à sévèrement active de l'adulte, lorsque la réponse aux traitements de fond, y compris le MTX, est inadéquate (Combe, 2002).

- L'étanercept

L'étanercept est un récepteur soluble du TNFα. C'est une protéine de fusion constituée d'une partie du récepteur soluble p75 et d'un fragment d'une IgG1 humaine. Il se fixe au TNFα circulant, l'empêchant ainsi d'atteindre les cellules et d'induire son activité biologique. Il s'agit donc d'un inhibiteur compétitif des récepteurs membranaires. Il s'administre par voie sous-cutanée; sa demi-vie est de 3 à 4 jours (Furst *et al.*, 2004). Il est indiqué en monothérapie dans l'AR active de l'adulte en cas de réponse inadéquate aux traitements de fond y compris le MTX, et également dans l'AR sévère, active et évolutive de l'adulte non précédemment traitée par le MTX (Le Loët *et al.*, 2005).

La démonstration de l'efficacité des anti-TNFα a été faite chez les patients ayant une

réponse insuffisante au MTX, situation qui correspond à leur autorisation de mise sur le marché actuelle. Les meilleurs résultats sur les symptômes cliniques et sur la prévention des lésions structurales ont été enregistrés au cours de l'AR récentes (moins de trois ans), en association avec le MTX, au cours des études ASPIRE pour l'infliximab (Rémicade®) (StClair *et al.*, 2004), TEMPO pour l'étanercept (Enbrel®) (van der Heijde *et al.*, 2006) et PREMIER pour l'adalimumab (Humira®) (Breedveld *et al.*, 2006). En l'absence d'essai contrôlé comparant l'efficacité des trois anti-TNFα, il n'y a pas de supériorité démontrée d'un produit par rapport à un autre et donc pas de hiérarchie recommandée dans leur utilisation (Falgarone *et al.*, 2007). L'efficacité clinique d'un anti-TNFα est évaluée après au moins trois mois d'utilisation à dose recommandée.

Le risque infectieux induit par les agents anti-TNFα doit inciter à la plus grande vigilance. Pour tous les patients, existe un risque modéré d'infections banales multiplié par 2 et un risque d'infections sévères évalué à 5 à 6 pour 100 patients/année (Bongartz *et al.*, 2006). Parmi ces infections sévères, il existe un risque augmenté d'infections bactériennes, principalement bronchopulmonaires, cutanées, urogénitales, articulaires …(Carli *et al.*, 2009).Certaines infections virales, et notamment celles dues au virus varicella-zoster (VZV) et à 'herpes simplex virus' (HSV), sont plus fréquentes et plus graves que dans la population générale (Wendling *et al.*, 2008). Le risque de tuberculose était important lors des premiers essais thérapeutiques : il s'agissait de tuberculoses pulmonaires ou extra-pulmonaires de présentation souvent atypique, le plus souvent par réactivation d'une tuberculose latente. Plusieurs études tendent à démontrer que le risque de tuberculose est plus important avec les anticorps monoclonaux (infliximab et adalimumab) qu'avec le récepteur soluble (étanercept), (Tubach *et al.*, 2009). Les recommandations de dépistage et de traitement prophylactique des tuberculoses latentes émises en 2004 ont considérablement réduit ce risque (Carmona *et al.*, 2005), mais il est nécessaire de rester très vigilant, surtout chez les sujets à risque de réactivation d'une tuberculose latente. Les autres pathologies infectieuses observées sous traitement anti-TNFα incluent d'autres infections sévères (septicémies, légionelloses, listérioses) et des infections opportunistes (pneumocystose, cryptococcose), (Bongartz *et al.*, 2006).

- **L'antagoniste du récepteur de l'interleukine 1**

L'interleukine 1 (IL-1) est un médiateur clé de la résorption osseuse et de la destruction cartilagineuse au cours de l'AR (Bang *et al.*, 2004). La liaison d'IL-1 à son récepteur IL-1R1

est empêchée par l'IL-1Ra qui est une cytokine existant à l'état naturel. Il s'agit d'un inhibiteur naturel de l'IL-1. Anakinra est un IL-1Ra recombinant non glycosylé produit dans *E. coli* et qui a fait l'objet de plusieurs études de phase II et III dans l'AR. Sa demi-vie est de 6 h, et sa biodisponibilité de 95% après injection sous cutanée. Il a obtenu en mars 2002 une autorisation de mise sur le marché par l'agence européenne. Il est préconisé à la posologie de 100 mg par jour en injection sous-cutanée. Il n'a pas signalé d'interactions médicamenteuses particulières. La surveillance des points d'injection permettra d'évaluer l'effet secondaire le plus fréquent. Les études ont permis d'observer une amélioration en 16 semaines des signes et symptômes de l'AR et un ralentissement de la progression des lésions radiographiques (Fleischmann *et al.*, 2003). Cependant, ce produit est estimé moins efficace que les anti-TNFα (Schiff, 2005).

Les contre-indications de l'Anakinra sont représentées par les hypersensibilités aux protéines dérivées de *E.coli*, au principe actif ou à l'un des excipients, l'insuffisance rénale sévère. Ce traitement est à éviter en cas d'infection évolutive (Bang *et al.*, 2004) **.** Soixante-dix pour cent des patients ont une réaction cutanée érythémateuse au site d'injection. Il existe un risque accru d'infections bactériennes sévères, surtout lorsque l'Anakinra est utilisé à forte dose (> 100 mg/j), mais il ne présente pas d'augmentation du risque de tuberculose, ni d'infections opportunistes (Salliot *et al.*, 2009). Son association à l'Etanercept est contre-indiquée. Enfin, on ne peut pas recommander d'utiliser ce médicament au cours des AR débutantes, en l'absence d'essais cliniques disponibles dans cette indication. Ce produit, dont la place reste mal définie dans la stratégie thérapeutique générale de l'AR, est un recours possible en cas de contre-indication aux anti-TNFα (Carli *et al*., 2009).

- **Les inhibiteurs du récepteur de l'IL-6**

Ce médicament est le premier anticorps monoclonal inhibiteur du récepteur de l'IL-6 appelé Tocilizumab ou Ro-Actemra®. Prescrit à la posologie de 4 à 8 mg/kg toutes les quatre semaines par voie intraveineuse, il a prouvé son efficacité en terme de réponse clinique et de moindre progression radiographique dans cinq études de phase III en Europe et au États-Unis réunissant plus de 4200 patients, aussi bien chez les patients naïfs de biothérapies (Smolen *et al.*, 2008 ; Genovese *et al.*, 2008a), que chez les patients en échec d'un ou de plusieurs anti-TNFα (Emery *et al.*, 2008). Son efficacité paraît plus marquée dans les formes récentes de la maladie. Le risque moindre d'infections et de lymphomes (par rapport aux anti-TNFα)

observé dans les essais cliniques doit être vérifié par d'autres études et une plus longue durée d'observation. La Commission européenne a accordé l'AMM du Tocilizumab en janvier 2009 pour le traitement de l'AR active, modérée à sévère, chez les patients adultes qui ont présenté soit une réponse inadéquate, soit une intolérance à un ou plusieurs traitements de fond ou à un ou plusieurs anti-TNFα. Chez ces patients, le tocilizumab peut être utilisé en monothérapie en cas d'intolérance au MTX ou lorsque la poursuite du traitement par MTX est inadaptée (Carli *et al*., 2009).

b. Les modulateurs de la stimulation des lymphocytes

- **Modulateur des lymphocytes T**

L'Abatacept un modulateur soluble du signal de costimulation CD80/CD86 nécessaire à l'activation des lymphocytes T (LT). C'est une protéine de fusion formée par le CTLA4 (protéine impliquée dans les voies de co-stimulation) et un fragment d'immunoglobuline G. Il est capable de bloquer les LT sans les éliminer ce qui calme l'action auto-immune de ces lymphocytes (Figure 6). L'étude pivot ATTAIN a permis de démontrer l'efficacité clinique de l'abatacept à la posologie de 10 mg/kg en perfusion intraveineuse dans les jours (1, 15, 30), puis toutes les quatre semaines associé au MTX, chez des patients atteints de l'AR ayant une réponse insuffisante à un anti-TNFα (Genovese *et al.*, 2005), et la réponse thérapeutique clinique se maintient à deux ans de traitement (Genovese *et al.*, 2008b).

Une autre étude a prouvé que l'abatacept était capable de ralentir la détérioration structurale chez des patients ayant une réponse insuffisante au MTX, avec un maintien à trois ans de ce résultat (Genant *et al.*, 2008 ; Kremer *et al.*, 2008). La tolérance du traitement paraît remarquable, il n'a pas été observé au cours de ces essais thérapeutiques de tuberculose, ni d'infections opportunistes (Kremer *et al.*, 2005 ; Weinblatt *et al.*, 2006 ; Salliot *et al.*, 2009).

Le risque d'infection est significativement augmenté sous Abatacept, les infections qui sont observées étaient principalement bronchopulmonaires, urinaires et cutanées (Smitten *et al.*, 2008).

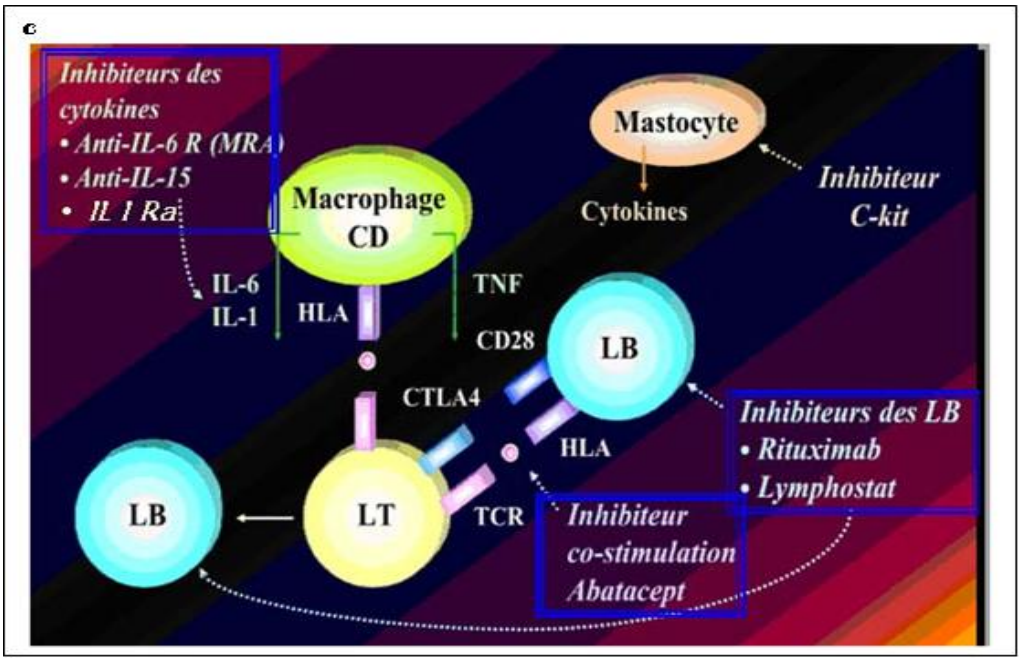


Figure 6 : Les cibles de la biothérapie dans le traitement de l'arthrite (Boissier, 2005).

• Modulateur des lymphocytes B

Le Rituximab (RTX) est un anticorps monoclonal humanisé contre le CD20 obtenu par génie génétique. Il comporte les régions constantes d'une IgG1 humaine et les régions variables des chaînes légères et lourdes d'origine murine (Figure 6). Initialement utilisé avec succès dans les lymphomes B sévères, le Rituximab a montré son intérêt dans certaines affections auto-immunes en permettant de rétablir la tolérance lymphocytaire B (Kremer *et al.*, 2005). Le Rituximab est un Ac thérapeutique ciblant sélectivement les cellules B, sans affecter les cellules souches, les cellules pro-B ou les plasmocytes, qui peuvent donc continuer à exercer normalement leur rôle protecteur (Wendling et Jorgensen, 2002).

L'étude REFLEX réalisée chez des patients atteints de l'AR ayant eu une réponse thérapeutique insuffisante à au moins un anti-TNFα a permis de démontrer l'efficacité clinique et structurale du RTX, utilisé à la posologie de 1000 mg en perfusion intraveineuse à j1 et à j15, associé au MTX (Cohen *et al.*, 2006). Cette efficacité est cependant retardée (deux à quatre mois) et significativement meilleure dans les AR séropositives (avec facteur rhumatoïde et/ou anticorps anti-CCP) que dans les AR séronégatives. Un retraitement (deux nouvelles perfusions de 1000 mg à j1 et j15) est possible après quatre mois, mais sera le plus souvent réalisé entre six et 12 mois. L'efficacité structurale du RTX a été confirmée après un

an d'utilisation, chez des patients ayant une réponse insuffisante au traitement anti-TNFα (Keystone *et al.*, 2009).

Le Rituximab est contre indiqué en cas d'insuffisance cardiaque ou de cardiopathie ischémique sévère. Les effets indésirables du RTX sont les réactions à la perfusion (en grande partie atténuées par une prémédication par méthylprednisolone) et le risque infectieux. Le risque d'infection sévère ne paraît pas significativement augmenté sous RTX avec pas de tuberculoses ni d'infections opportunistes (Edwards *et al.*, 2004 ; Cohen *et al.*, 2006 ; Salliot *et al.*, 2009). Cependant, la déplétion en lymphocytes B peut exposer à des infections bactériennes parfois sévères (principalement bronchopulmonaires), surtout chez les patients à risque tel que Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), et d'autant qu'il existe une diminution du taux sérique d'immunoglobulines IgG ou IgM (Carli *et al*., 2009).Ces données doivent donc conduire à la vigilance et il est recommandé de réaliser, avant tout traitement (et retraitement) par RTX un bilan préthérapeutique comportant un examen cardiovasculaire, une évaluation du risque infectieux pleuropulmonaire, un dosage des lymphocytes B (CD19 et CD20) et un dosage des immunoglobulines sériques.

1.7.2.3. Stratégies thérapeutiques

De nombreuses stratégies médicamenteuses ont été proposées (Breedveld et Kalden, 2004 ; O'Dell, 2007) : monothérapie séquentielle, escalade ou *step-up*, combinaison thérapeutique d'emblée, désescalade ou *step-down*. Aucune de ces différentes stratégies n'est dans l'absolu supérieure à une autre, car toutes les AR n'ont pas le même potentiel évolutif, ni obligatoirement un pronostic structural péjoratif. Cependant, plusieurs études comme COBRA (Landewé *et al.*, 2002) ; COMET (Emery *et al.*, 2008) et BeST (Goekoop-Ruiterman *et al.*, 2005) tendent à démontrer que les combinaisons thérapeutiques initiales (le plus souvent MTX plus anti-TNFα) donnent de meilleurs résultats que les monothérapies, aussi bien pour la rapidité d'obtention d'une rémission, qu'en terme d'évolution structurale.

Il existe un large consensus pour débuter un traitement de fond le plus tôt possible, idéalement dans les 12 premières semaines d'évolution. Cette « fenêtre d'opportunité » est la période où le traitement a le plus de chances de permettre une rémission rapide, qui est corrélée à un meilleur pronostic fonctionnel et structural à long terme (Verstappen *et al.*, 2007 ; Alectaha *et al.*, 2007). De plus, une bonne réponse à un premier traitement de fond est associée à une rémission plus durable (Verstappen *et al.*, 2005). Si l'AR débutante est active,

sans signes de sévérité, le MTX par voie orale est choisi en première intention, en commençant par 10 mg par semaine, progressivement augmenté si nécessaire jusqu'à 20–25 mg par semaine. Une réponse insuffisante conduit à une prescription parentérale par voie intramusculaire ou sous-cutanée. En cas de contre-indication au MTX, on peut utiliser le LEF (20 mg/j) ou la Salazopyrine (2 à 3 g/j). Si l'AR est active et comporte des signes de sévérité (signes généraux, manifestations extra-articulaires, lésions structurales radiographiques), une association de traitements de fond doit être prescrite d'emblée : soit une association de DMARD (par exemple, MTX plus SZP plus HCQ), soit l'association de MTX et d'un anti-TNFα.

La corticothérapie est généralement prescrite au début à dose minimale suffisante pour contrôler les symptômes, en attendant l'efficacité du traitement de fond. Un sevrage de corticoïdes sera proposé dès que cette efficacité sera obtenue. La nécessité de maintenir une dose de corticoïdes égale ou supérieure à 0,10–0,15 mg/kg (corticodépendance) doit inciter à modifier la thérapeutique de fond.

La recherche a permis depuis ces dernières années des progrès considérables dans la compréhension des mécanismes immunologiques de la maladie, mais les causes initiales du déclenchement de l'AR demeurent inconnues. Aucune mesure préventive n'est donc actuellement envisageable et aucun traitement « étiologique » n'est capable de l'éradiquer. Pour pallier aux effets secondaires des traitements antiarthritiques, les recherches scientifiques portent sur plusieurs plantes utilisées traditionnellement pour soulager des troubles liés à des maladies arthritiques, aux rhumatismes et aux problèmes d'atteinte des articulations.

2. LA PHYTOTHERAPIE

La phytothérapie dérivée du grec «phyton», qui signifie végétal, décrit le traitement des maladies et leur prévention par le recours aux plantes ou à leurs composants tels que feuilles, fleurs, racines, fruits ou graines (Ollier, 2000).

Les personnes souffrant d'affections rhumatismales peuvent tirer un grand bénéfice de certains remèdes à base de plantes, ce qui tient peut-être au mode d'action des préparations: les différents principes actifs contenus dans ces dernières agissent souvent à différents stades de l'apparition de la maladie et peuvent ainsi se compléter. La phytothérapie d'aujourd'hui est le fruit d'une longue histoire. Durant l'Antiquité déjà, les médecins traitaient avec beaucoup de succès un certain nombre de pathologies au moyen de préparations à base de plantes médicinales. Des végétaux ont également servi de point de départ au développement de nombreux médicaments, comme l'écorce de saule pour l'acide acétylsalicylique (l'aspirine) ou la digitale pourpre pour le cardiotonique Digitalis (Ollier, 2000).

2.1. Phytothérapie anti-arthritique

2.1.1. Ecorce du saule blanc

L'écorce du saule blanc (*Salix Alba*), (Figure 7A) contient des tannins et de la salicine, dont le représentant majeur est le salicoside, un glucoside de l'acide salicylique. Hydrolysée dans l'intestin par les bactéries de la flore intestinale, la salicine génère de l'alcool salicylique qui est rapidement métabolisée en acide salicylique, le support de l'activité pharmacodynamique (Chrubasik, *et al.*, 2000). Il s'agit d'un inhibiteur des cyclo-oxygénases impliquées dans la biosynthèse des prostaglandines et des thromboxanes. Une étude clinique a démontré que l'extrait d'écorce de saule procure des bienfaits pour soulager les douleurs arthritiques grâce à la salicine qu'elle contient, sans avoir les effets indésirables des AINS (Chrubasik, *et al.*, 2000).

2.1.2. La spirée ulmaire

La spirée ulmaire *(Spiraea ulmaria)* contient de faibles quantités En 1835, Karl Löwig extrait de la spirée ulmaire (Figure 7B) encore appelée reine-des-prés, une substance qu'il appelait «acide spirique» et montra qu'elle est chimiquement identique à l'acide salicylique (aldéhyde salicylique et salicylate de méthyle). Ces deux salicylés peuvent générer de l'acide salicylique et ainsi engendrer une activité antiinflammatoire (Brazier, 2003).

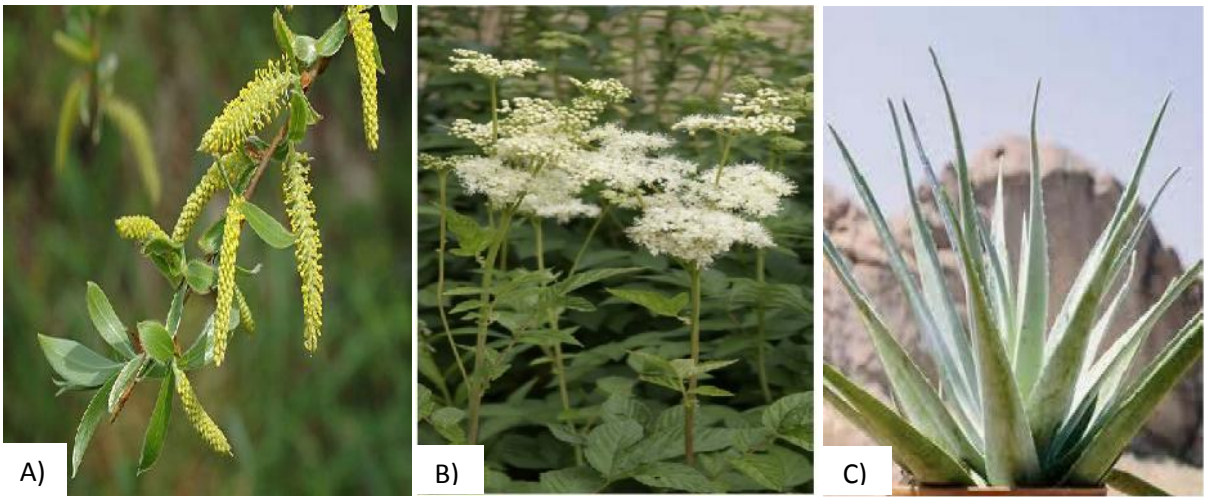


Figure 7. Quelques plantes utilisées dans le traitement de l'arthrite. A : Le saule blanc, B : La spirée ulmaire, C : *Aloes vera*.

2.1.3. Aloes vera

L'*Aloes vera* (Figure 7C) est cultivée en Europe et dans plusieurs régions de l'Inde, y compris la région du nord-ouest d'Himalaya. L'aloès véra a été une des plantes les plus importantes utilisées dans la médecine traditionnelle. L'anthraquinone, l'anthracène, l'acide cinnamique et l'acide anthranilique qui sont trouvés dans l'Aloès vera, sont responsables de son activité. L'aloès véra est employé dans le traitement de l'eczema doux. Elle a également des propriétés antibactériennes et antifongiques, utilisées comme épurateur de sang, anti-inflammatoire, diurétique, spermatogenique, laxatif, et purgative. La propriété Anti-arthritique du d'aloès vera est due au composé d'anthraquinone. L'aloès véra stimule le système immunitaire et c'est un agent anti-inflammatoire puissant. L'application topique de l'extrait de l'aloès vera dans la réduction de l'inflammation dans l'arthrite induite par l'adjuvant chez les rats Dawley Sprague

2.1.4. *Boswellia serrata*

La résine produite par l'écorce du *Boswellia* est depuis longtemps utilisée pour soulager les rhumatismes, les inflammations, l'asthme ainsi que la colite ulcéreuse. Elle contient des triterpènes et des acides boswelliques. Des études réalisées en laboratoire ont démontré que les acides boswelliques inhibent la 5-lipoxygénase et entraînent ainsi l'inhibition de la biosynthèse des Leucotriènes (Sailer *et al.*, 1998).

2.1.5. La griffe du diable

La racine de cette plante contient des flavonoïdes et des glycosides iridoïdes : harpagosides et procumbosides. Les harpagosides inhibent la lipoxygénase et les cyclo-oxygénases ainsi que la synthèse du TNFα. Ces glycosides possèdent également des effets cardiaques et stimulent la sécrétion d'acide gastrique (Fiebich *et al.*, 2001). La Commission Europienne de Phytothérapie en Allemagne reconnaît ces usages ainsi que celui d'adjuvant thérapeutique pour les troubles dégénératifs de l'appareil locomoteur. Les effets de l'harpagophytum sont rapportés dans une étude portant sur la douleur ostéoarthritique (Chrubasik, *et al.*, 2002).

2.1.6. La griffe de chat

La griffe-de-chat est une plante qui pousse dans la forêt amazonienne et dans d'autres zones tropicales au Mexique et en Amérique Latine. L'écorce de cette plante est utilisée pour sa composition en alcaloïdes oxindoliques pentacycliques et tétracycliques dont la rynchophylline. Ses usages traditionnels visent à guérir l'ulcère peptique, la gastrite, la colite et l'arthrite. Des études *in vitro* ont montré que les alcaloïdes présents dans la griffe de chat peuvent inhiber l'inflammation de 46 à 89 % en inhibant la production de la prostaglandine PGE2 et le TNFα. Elle diminue également l'activité nerveuse sympathique (Mur *et al.*, 2002). Ces alcaloïdes sont de faibles inhibiteurs du CYP3A4. En outre, ils stimulent la production des interleukines IL1 et IL6 par les macrophages alvéolaires, démontrant ainsi des propriétés immunostimulantes. Les essais cliniques portant sur les alcaloïdes de la griffe de chat montrent une sécurité relative et un bienfait modeste dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Mur *et al.*, 2002).

2.1.7. Le *Curcuma longa* et le gingembre

Les rhizomes de *Curcuma* et de gingembre sont utilisés de façon traditionnelle dans les cas de dyspepsie, de flatulences et de douleurs abdominales. Leurs préparations possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et anti-nauséeuses (gingembre). La curcumine inhibe, *in vitro*, la production du TNFα induite par les lipopolysaccharides dans les macrophages humains ainsi que le thromboxane (Srivastava *et al.*, 1995). Les extraits de gingembre inhibent les COX et ont un faible effet antiplaquettaire par inhibition modérée du thromboxane. Ils pourraient avoir des bienfaits modestes pour l'ostéoarthrose (Andersen *et al.*, 2000).

2.1.8. Le piment de Cayenne

Le piment de Cayenne (*Capsicum annuum*) contient des capsaïcinoïdes, dont la capsaïcine. Cette substance possède un fort pouvoir thermogène et, elle est reconnue pour aider à soulager les douleurs chroniques et elle peut s'avérer efficace dans le cas de douleurs arthritiques (Zimmer *et al.*, 2012).

2.2. Principales substances végétales actives

Chaque espèce végétale contient un certain nombre de substances qui procèdent de métabolisme et s'élaborent comme produit secondaire. Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, on recense plusieurs milliers de métabolites et sont classées selon leur appartenance chimique. Parmi ces substances on trouve les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, les huiles essentielles et les alcaloïdes qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Judd *et al.*, 2002).

2.2.1. Les composés phénoliques

Les polyphénols ou composés phénoliques sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimate et celle de l'acétate (Bruneton *et al.*, 1999). La diversité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine synthétique, et elle augmente souvent avec la participation simultanée du shikimate et l'acétate conduisant à l'élaboration de composés mixtes (flavonoïdes, stiblène, xanthones, etc.). Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés (plus de 8000 molécules) dans les plantes et dans les aliments d'origine végétale (Figure 8).

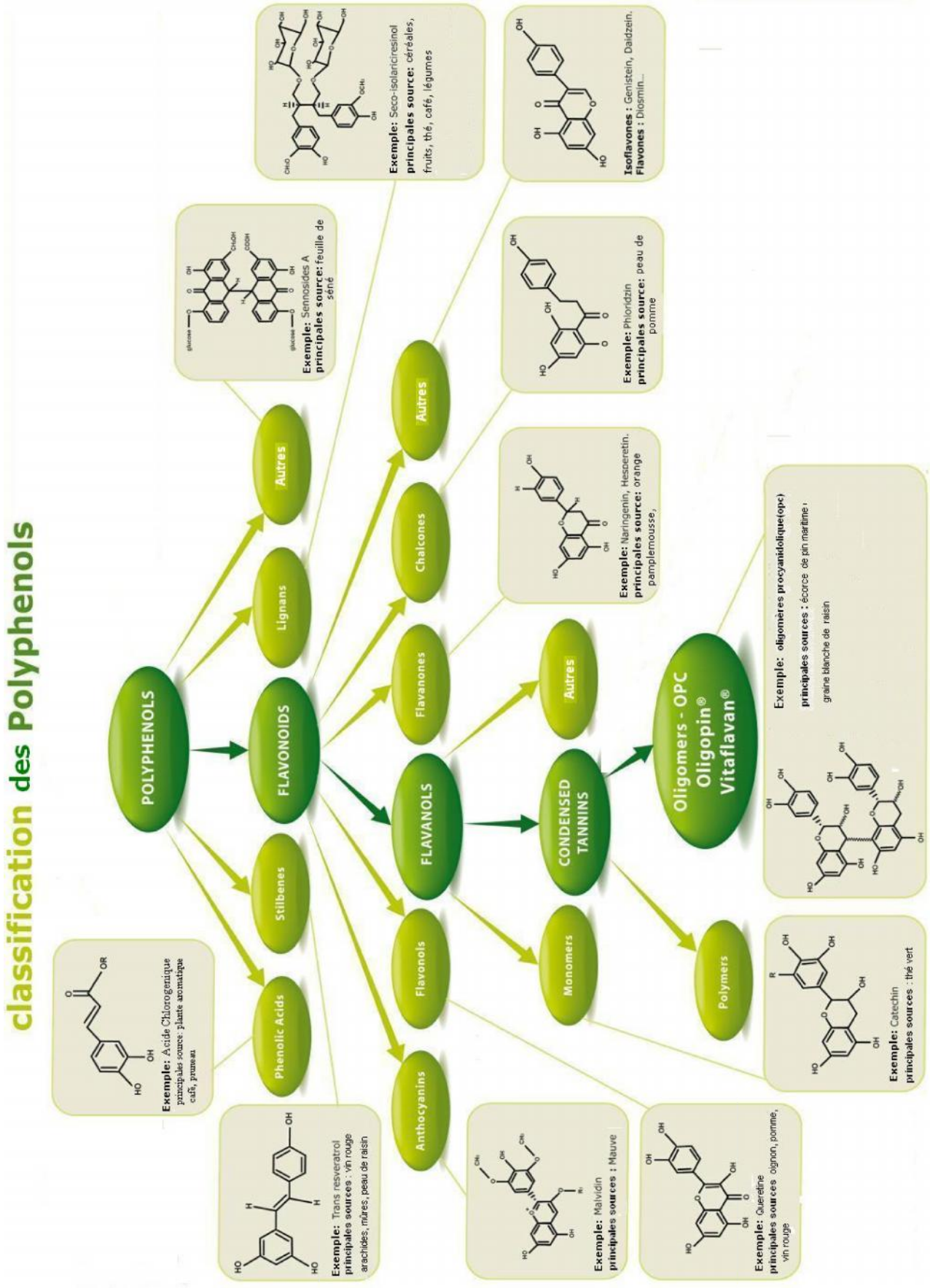


Figure 8 Classification des polyphénols selon la structure chimique.

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de molécules divisées en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (-OH), (Tapiero *et al.*, 2002). selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (Bruneton *et al.*, 1999). Les différentes classes de ces composés phénoliques, et les plantes qui les renferment sont représentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Principales classes des composés phénoliques (Bruneton, 1999 ; Hennebelle, 2006).

Nombre de C	**Squelette de base**	**Classe**	**Exemples**	**Plantes**
6	C6	Phénols simples	Cathécol, hydroquinone	Busserole
7	C6-C1	Acides phénols benzoiques	Ac. gallique, Ac. salysalique, vanilline	Artichaut, Saule
8	C6-C2	Acétophénones 3-acétyl6	méthoxybenzaldehyde	Saule
9	C6-C3	Acides phénols cinnamiques	Ac. coumarique, Ac.caféique	Romarin, Marronnier d'inde
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine	Drosera spp.
13	C6-C1-C6	Xanthones	Bellidifoline, mangoctine	Racine de gentiane, Centaurée
14	C6-C2-C6	Hydrangénol, Pinosylvine	Stiblènes	Raisin, pin
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine Roténoide	Ginkgo Thym Camomille
18	(C6-C3)2	Lignanes	Matairésinol	Chardon
30	(C6-C3-C6)2	Bi flavonoïdes	Amentoflavone Hinokiflavone	Carcinia Hypericum
n	(C6-C3-C6)n	Tanins condensés (proanthocyanidols	Aesculitanins	Marronnier d'inde, vigne

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique. Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes. Contrairement aux antioxydants synthétiques comme le butylhydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène (BHT). Les polyphénols n'ont aucun effet nuisible sur la

santé humaine (Bounatirou *et al.*, 2007). Les polyphénols ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils permettent aux végétaux de se défendre contre les rayons ultraviolets. Certains d'entre eux jouent le rôle de phytoalexines comme les isoflavonols permettant de lutter contre les infections causées par les champignons, ou par les bactéries (Makoi et Ndakidemi *et al.*, 2007).

Les polyphénols sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent l'attention des insectes pollinisateurs, ou servent au contraire à dessiner les formes pour éloigner les prédateurs. D'autre sont des inhibiteurs d'enzymes et interviennent dans la protection de l'homme de certaines maladies (Bruneton *et al.*, 1999). Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additifs, colorants, arômes ou agents de conservation (Bruneton *et al.*, 1999). Les acides phénoliques sont contenus dans un certain nombre de plantes médicinales (Psotová *et al.*, 2003). Comme exemple; acide chlorogénique, acide caféique, acide protocatéchique, acide vanillique, acide férulique, acide sinapique et acide gallique (Hale, 2003). Ils sont considérés comme substances phytochimiques avec des effets antioxydants et anti-inflammatoires. Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique (Psotová *et al.*, 2003). L'acide férulique et l'acide caféique empêchent la formation du cancer des poumons chez les souris, l'acide gallique inhibe la formation du cancer oesophagien chez les rats (Hale *et al.*, 2003).

2.2.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de composés naturels du règne végétal (Ghedira, 2005), caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols (Toufektsian *et al.*, 2008). Plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des f1avonoïdes (Figure 9) peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxy, méthoxy, méthyl, benzyl et isoprényl (Beecher *et al.*, 2003 ; Williams et Grayer, 2004 ; Kueny-Stotz *et al.*, 2008). La plupart des flavonoïdes diététiques dans les aliments sont des 3-O-glycosides, mais peuvent également exister sous des formes aglycones (Medic- Šaric *et al.*, 2004). La prise moyenne des flavonoïdes par l'homme s'étend de 25 mg/jour à 1 g/jour (Wang et Mazza, 2002).

2.2.2.1. Structure chimique et classification

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone constitués de deux cycles phényles, les cycles A et B, reliés par une chaine à trois carbones (structure en C6-C3-C6). La chaine en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisée pour former le cycle C. C'est le noyau Flavone de base (Bruneton *et al.*, 1999). Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules (Harbone, 1988) dont les plus importantes sont : les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanidines (Figure 10). Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous la forme libre (génine) ou sous la forme de glycoside (C ou O glycosylées). On les retrouve dans toutes les plantes vasculaires où elles peuvent être localisées dans divers organes : racines, tiges, feuilles et fruits (Bruneton, 1999).

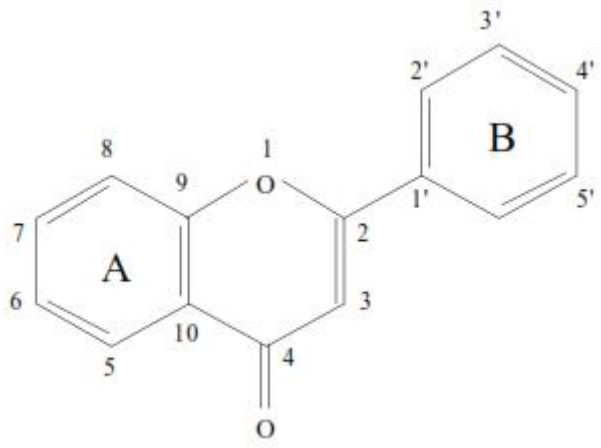


Figure 9 : Structure de base des flavonoïdes

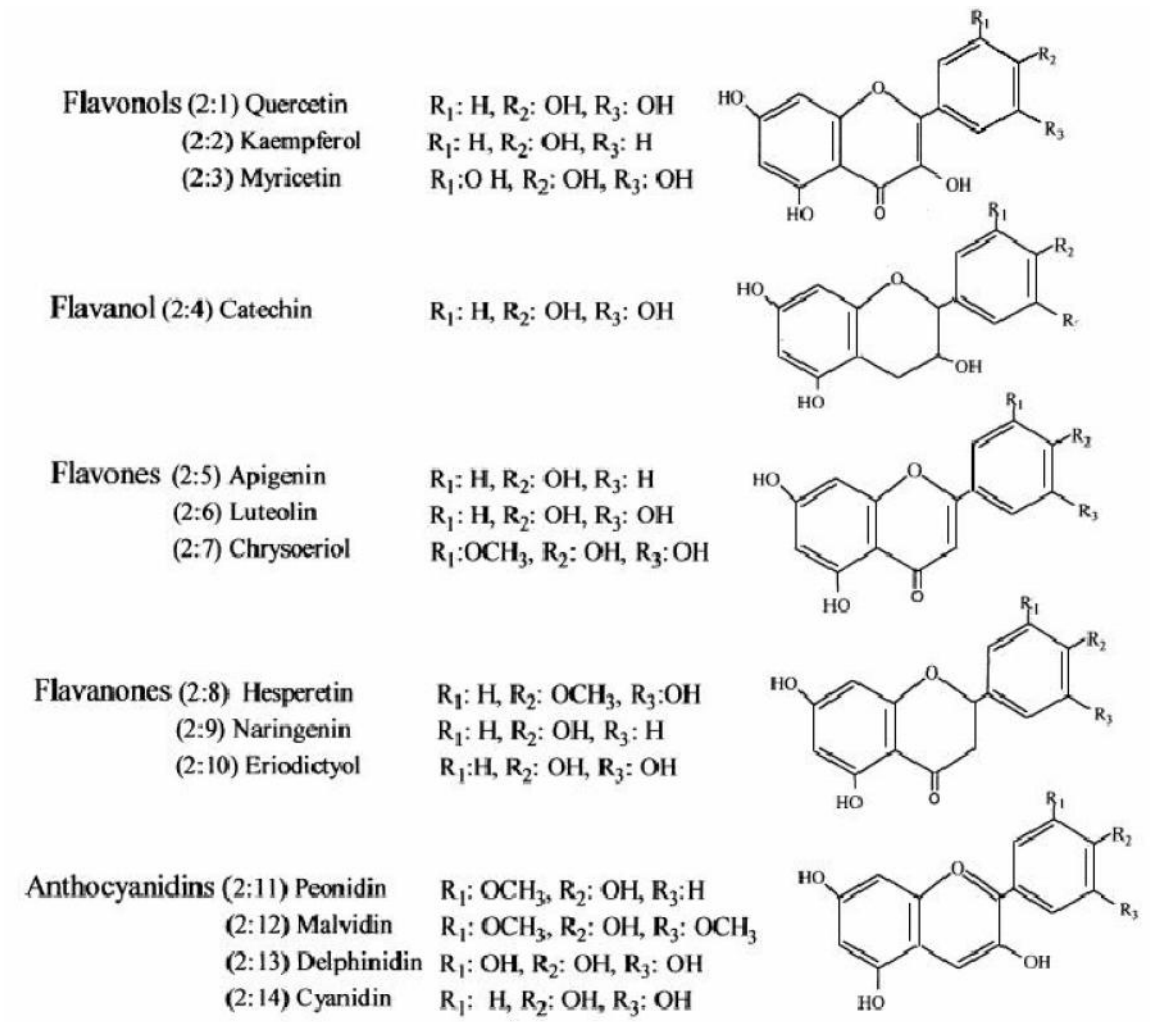


Figure 10 : Les principales classes de flavonoïdes

2.2.2.2. Propriétés biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont attiré l'intérêt scientifique depuis plusieurs décennies. D'abord à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et de leurs rôles dans la pigmentation, aussi parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes (Manach *et al.*, 2004). Ils ont également pour fonction de protéger ces dernières contre les pathogènes d'origine virale ou bactérienne et contre les prédateurs comme les insectes (Bravo, 1998). Plus encore, les flavonoïdes sont impliqués, chez les plantes, dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse et ils jouent un rôle de protection contre les effets néfastes des rayons ultraviolets en agissant comme antioxydant (Havsteen, 2002). Chez l'homme, les flavonoïdes peuvent inhiber la production des espèces oxygénées réactives (reactive oxygen species : ROS) par action sur les enzymes productrices de ces ROS (Pietta, 2000) comme la

xanthine oxydase (Middleton et al, 2000; Potapovich et Kostyuk, 2003 ; Boumerfeg *et al*., 2009). Les flavonoïdes parviennent à capturer les espèces réactives de l'oxygène associées au stress oxydatif, les empêchant ainsi de créer des dommages cellulaires. En effet, i1s sont capables d'inactiver et de stabiliser les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle fortement réactif. Ils inhibent aussi l'oxydation des LDL et, de ce fait, peuvent prévenir l'athérosclérose et diminuer les risques de maladies cardiovasculaires (Tu *et al.*, 2007). Certains flavonoïdes ont un potentiel d'agent vasodilatateur (Woodman et Chan, 2004) et broncho relaxant (Djelili *et al.*, 2012). Ils ont été surnommés les « modificateurs naturels des réponses biologiques» (Middleton *et al.*, 2000). Une panoplie d'études *in vitro* a ensuite montré que les flavonoïdes peuvent moduler l'activité d'une grande variété d'enzymes impliquées dans des voies importantes qui régulent la division et la prolifération cellulaire, l'agrégation des plaquettes, la détoxification, l'inflammation et la réponse immunitaire (Middleton *et al.*, 2000), ils sont donc capables de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires.

Récemment, plusieurs études épidémiologiques et des études réalisées sur différentes lignées cellulaires ont démontré le potentiel antitumoral et anticancéreux des flavonoïdes (Birt *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2001 ; Ramos, 2007) notamment les molécules appartenant à la sous-classe des flavones efficaces contre le cancer du colon (Wenzel *et al.*, 2000) et les poumons (Liu el al.. 2005). De plus, les anthocyanidines ont montré des effets d'inhibition de la migration de cellules provenant de tumeurs hautement invasives et proliératives, les glioblastomes (Lamy *et al.*, 2007).

De nombreux travaux ont indiqué que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (Da Silva *et al.*, 1994 ; Galati *et al.*, 1994 ; Middleton, 1996). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (Mookerjee *et al.*, 1986 ; Namgoong *et al.*, 1994). Leur effet sur les lymphocytes B ou T peut être variable: en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que la myricétine est active sur les lymphocytes B (Mookerjee *et al.*, 1986). L'effet antiproliératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase), (Mookerjee *et al.*, 1986 ; Namgoong *et al.*, 1994). Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération

d'histamine des basophiles et des mastocytes (Middleton and Drzewiecki, 1984). La quercétine a un effet anti-inflammatoire en inhibant les enzymes de synthèse (la cyclooxygénase (pour les postaglandines) et la lipo-oxygénase (pour les leucotriènes) des principaux médiateurs de l'inflammation (Middleton et Drzewiecki, 1984).

Des études effectués par Haqqi *et al.*, (1999), Singh *et al.*, (2002), Ahmed *et al.*,(2004, 2008) et Yun *et al.*, (2008) ont montré que les flavonoïdes ont un effet anti-inflammatoire et anti-arthritique. Ils peuvent réguler l'expression des cytokines (IL1, IL6, et TNFα), des chimiokines, des MMP, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'oxyde nitrique (NO). des études *in vivo*, effectués par Donà *et al.*,(2003) et Aktas *et al.*, (2004) ont trouvé que les flavonoïdes et les polyphénols inhibent l'inflammation dans des modèles de souris en affectant le fonctionnement des cellules T et des neutrophiles. Les flavonoïdes et les polyphénols inhibent la dégradation du protéoglycanes et du collagène de type II du cartilage humain (Vankemmelbeke *et al.*, 2003). Ces substances inhibent l'expression et l'activité des MMP impliqués dans la dégradation de la matrice et cela peut avoir un effet suppresseur sur la dégradation du cartilage et de l'os. (Cheng *et al.*, 2003).

2.2.3. Les tanins

Les tanins sont une famille complexe de principes actifs qu'on trouve dans l'ensemble des végétaux, et dans toutes leurs parties. Ils ont la capacité de former des complexes avec des macromolécules comme les protéines et des liaisons entre les fibres de collagène, d'où viennent la plupart de leurs propriétés (Paolini *et al.*, 2003). Leur structure chimique est particulièrement variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique, il existe deux catégories de tanins, d'origine biosynthétiques différentes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Paolini *et al.*, 2003). Les tanins hydrolysables sont des esters d'oses généralement le glucose et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique (acide gallique, dans le cas des tanins galliques, ou acide héxahydroxydiphénique ouHHDP, dans le cas des tannins ellagiques), (Bruneton, 1999). Les tanins condensés ou tanins catéchiques ou proanthocyanidols sont des polymères flavanoliques, constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone- carbone le plus souvent C4-C8 ou C4-C6 tel la catéchine ou l'épicatéchine.

Les tanins sont des métabolites secondaires des plantes, leur conférant une protection contre les prédateurs (herbivores et insectes). La propriété astringente des tanins est à la base

d'autres propriétés (vulnéraire, antidiarrhéique ...). Elle permet la cicatrisation, l'imperméabilisation de la peau et des muqueuses, favorise la vasoconstriction des petits vaisseaux (Paolini *et al.*, 2003). En outre, les tanins ont un très grand pouvoir antibactérien (Bassene *et al.*, 1995 ; Baba Moussa, 1998 ; Kolodziej, 1999), antiviral (Nonaka *et al.*, 1990 ; Pousset *et al.*, 1993 ; Hong *et al.*, 2000), anti-inflammatoire (Mota *et al.*, 1985) et une activité antimutagène (Kaur *et al.*, 2000). Les plantes riches en tanins sont utilisées dans les cas de rhume, de maux de gorge, les problèmes de sécrétions trop importantes, les infections internes ou externes, blessures et brûlures (Bruneton, 1999).

2.2.4. Les saponosides

On entend par saponosides, des hétérosides aglycones de structure stéroïde ou triterpénique qui tiennent une grande place parmi les substances d'origine végétale. Les saponosides ont une activité expectorante en rendant un peu moussant le mucus des bronches inflammatoires et facilitent l'expectoration. De plus, ils sont de puissants hémolysants et possèdent des propriétés édulcorantes, largement utilisées dans l'industrie agro-alimentaire (Bruneton, 1999). D'autre part, les travaux de Steinmetz *et al.* (1993) ont mis en évidence l'activité antifongique de saponosides triterpéniques extraits du lierre sur les levures et les dermatophytes. Dans un même ordre d'idée, les saponosides l'hédérine ont montré une activité anti tumorale et antibactérienne (Yun, 2003).

2.2.5. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des molécules trouvées principalement chez les végétaux, mais aussi chez les animaux et chez certains micro-organismes. Leur structure chimique de base est un hétérocycle azoté sauf pour quelques substances dans lesquelles l'azote est extra cyclique (c'est le cas de la colchicine et de l'éphédrine). Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène dans leurs structures, propriétés et effets biologiques. Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique (Bruneton, 1999). Les alcaloïdes sont aujourd'hui nommés d'après la plante qui les a fournis, toujours avec une terminaison en "ine". D'une façon générale, les alcaloïdes sont amers et utilisés comme apéritifs (Bruneton, 1999).

3. LA PLANTE MEDICINALE *AJUGA IVA*

Le nom Ajuga vient du mot latin "Jugum": joug. avec le suffixe "a": sans joug, du fait que la corolle est dépourvue de lèvre supérieure. Iva, est un ancien nom féminin latin utilisé pour la première fois pour cette plante (Ghedira *et al.*, 1991). Le genre Ajuga comprend environ 40-50 espèces herbacées annuelles et vivaces (El Hilaly *et al.*, 2004).

Ajuga iva (ivette musquée), localement appelée Chendgoura, est une petite plante vivace de goût amer de 10-20 cm, à tiges vertes rampantes et velues, à feuilles vertes de 14-25 mm de longueur, denses et couvertes de duvets. Les fleurs sont violettes, roses, ou jaunes, de 20 mm de longueur, 2-4 par verticille à l'aisselle des feuilles (Figure 11), calice velu-laineux, à dents triangulaires, lancéolées, plus courtes que le tube (Girre, 2001). La lèvre supérieure de la corolle est réduite ou absente et la lèvre inférieure est divisée en trois lobes velus. Les lobes latéraux sont petits, alors que le lobe central est relativement plus large décoré dans sa base par un axe central jaunâtre avec des spots de la même couleur de la fleur, généralement en violet. A l'intérieur de la fleur il y a quatre étamines liées à quatre carpelles noirs. Les graines sont marrons et ont la forme des graines de *Nigella sativa* (Halimi, 2004).

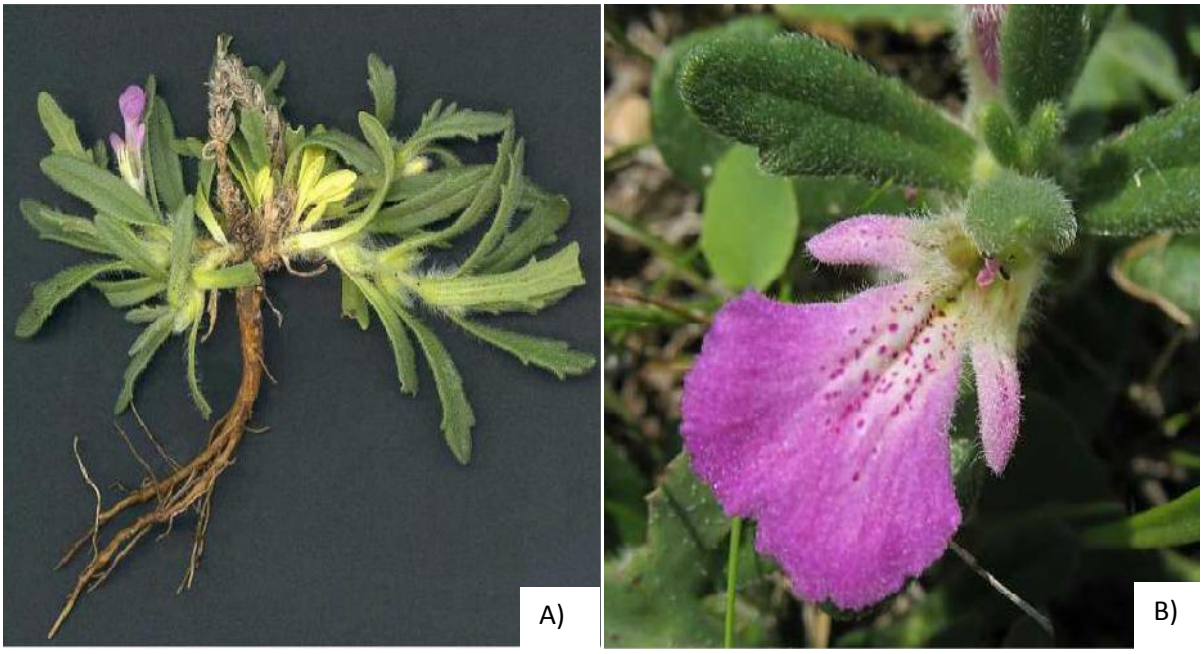


Figure 11: Quelques photos d' *Ajuga iva*. (**A**) la plante entière, (**B**) les feuilles et les fleurs (http://fr.wikipedia.org/wiki/Ajuga_iva).

3.1. Distribution géographique et habitat

Ajuga iva est une plante aromatique qui se développe dans le sol profond des terres friches à 2700 m d'altitude, dans les régions arides où elle croît dans les champs, très répandue dans les pelouses et les forêts du Tell algérien (Baba Aissa, 2000). L'ivette musquée pousse dans la période étendue du printemps jusqu'à la fin de l'été. La période de floraison est entre Mai et Juin (Batanouny *et al*., 1999 ; Halimi, 2004). Elle est largement distribuée dans la région méditerranéenne : le sud de l'Europe et le nord de l'Afrique, en particulier en Algérie, Maroc, Tunisie, et en Egypte (Halimi, 2004).

3.2. Nomenclature de la plante

Règne: Plantae
Division: Spermatophyta (Angiospermae)
Classe: Dicotyledones
Ordre: Tubiflorae
Famille: Lamiaceae / Labiatae
Genre: *Ajuga*
Espèce: *iva*
Autre: (L.) Schreber

Nom commun (Français): Bugle Ivette, Ivette-musquée, Ivette, Petit if, Bugle

Nom botanique : *Ajuga iva* (L.) Schreb.

Synonyme : *Ajuga iva* subsp. iva, *Ajuga humilis*, *Ajuga moschata*, *Teucrium iva* L.

Nom vernaculaire : (Arabe) Chendgoura, (Berber): Taftelba

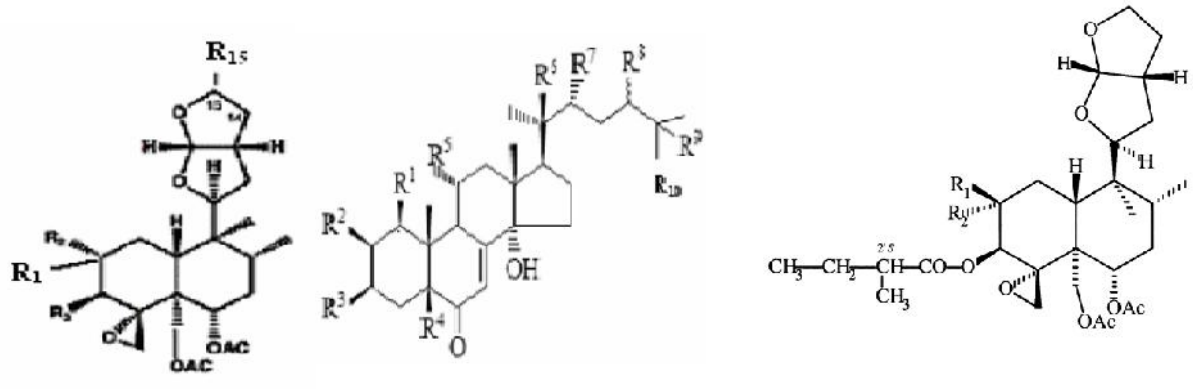
Nom anglais : Musky Bugle, Herb ivy

Nom maltais **:** Xantkura

3.3.Composition chimique de la plante

Ajuga iva contient une grande quantité des composés phénoliques ; les flavonoïdes et les tannins (El Hilaly *et al.*, 2004 ; Baghiani *et al.*, 2011). Elle contient aussi les anthocyanes, les acides phénoliques et d'autres substances en particulier l'ajugarine (Halimi, 2004). Les études ont montrés que l'ivette musquée contient les trois majeurs ecdystéroides (makisterone A, 20-hydroxyecdysone et cyasterone), en plus du 24,28-dehydromakisterone A et les deux nouveau phytoecdystéroides (22-oxocyasterone et 24,25-dehydroprecyasterone), (Figure 12). Elle contient aussi le 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, le polypodine B et le 14,15-dihydroajugapitine (Wessner *et al.*, 1992 ; Bondi *et al.*, 2000). Ben Jannet *et al.* (1999) ont

isolés les ivaïdes A, B et C d'*Ajuga iva*. Les cicatrisants (externes), les diterpénoides (clérodane), les iridoïdes et saponosides acides sont aussi des composés chimiques que les chercheurs ont trouvés dans l'*Ajuga iva.* Bennaghmouch *et al.* (2001), ont isolé à partir de l'espèce *Ajuga iva* sept flavoniques aglycones (quercétine, lutéoline, chrysoériol, 5,5'-dihydroxy 7,4'-diméthoxyflavone, 5,7- dihydroxy 4',5'-diméthoxyflavone, apigénine, naringénine), (Figure 13).



Diterpénoïdes	R1	R2	R3	R15	C14-C15
Ivain IV	H	OH	EtCH(Me)COO	H	-CH2-CH2
14,15-dihydroajugapitin	H	OH	EtCH(Me)COO	H	CH2-CH2
Phytoecdystéroïdes	**R8**	**R9**	**R10**	**R1=R4=R5**	**R2=R3=R6=R7**
Ajugastérone B	CH2CH3	CH2OH	C=CH2	H	OH
Makistérone A	CH3 (K)	OH	CH3	OH	OH

Figure 12 : Structures de quelques composés diterpénoïdes et phytoecdystéroïdes de l'*Ajuga iva* (Bondi *et al.*, 2000).

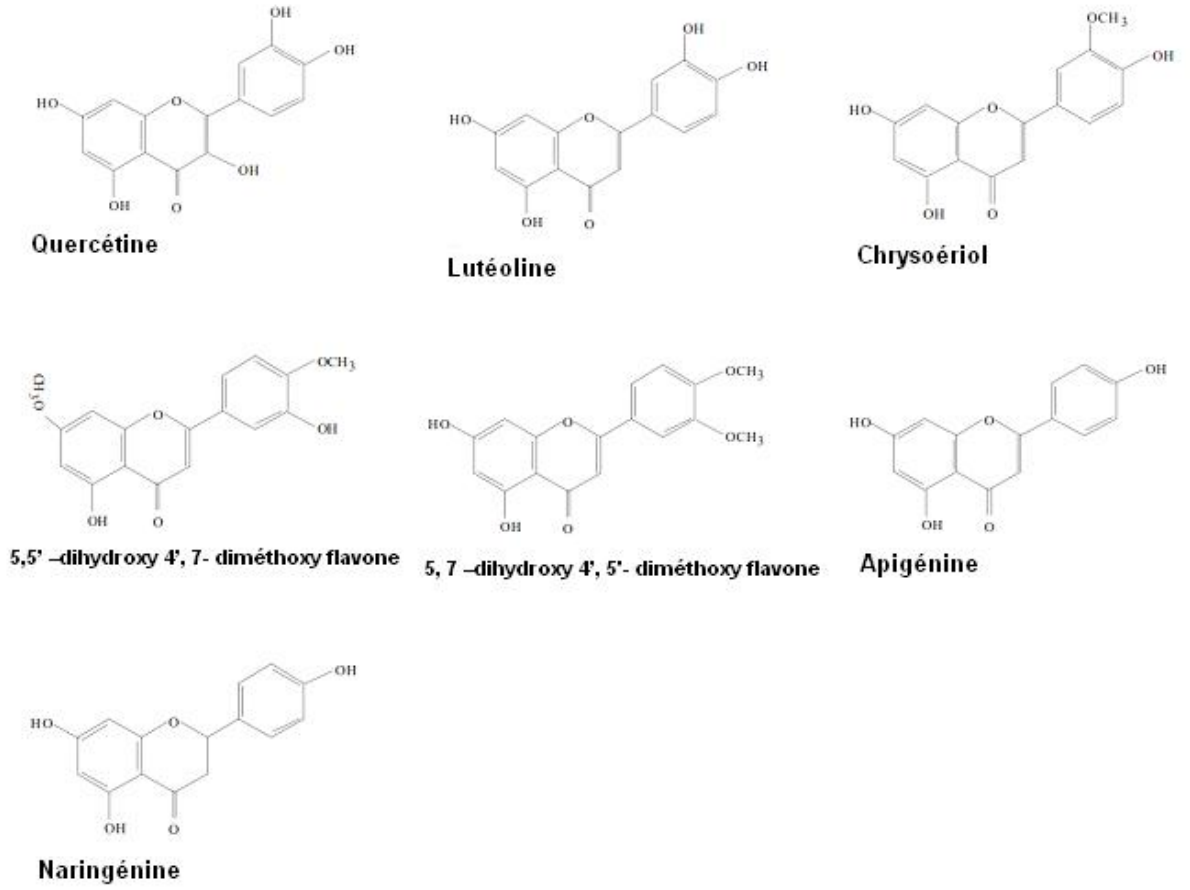


Figure 13 : Structures de quelques flavonoïdes isolés a partir de l'*A. iva* (Bennaghmouch *et al.*, 2001).

3.4. Utilisation traditionnelle de la plante

En médecine traditionnelle, *Ajuga iva* est utilisée entière sans racines. En Algérie, elle est employée, après macération aqueuse de plusieurs jours ou en poudre, pour traiter le diabète et l'hypertension. Elle est aussi consommée en poudre sèche ou avec du miel pour surmonter son goût amer, pour traiter les troubles gastro-intestinales et contre l'ulcère de l'estomac. L'infusion de 20 à 30 g de Chendgoura dans un litre d'eau; 2 ou 3 tasses par jour est indiquée contre la fièvre, la diarrhée et les gaz. Elle est efficace contre les maux de tête et les maux de dents. En usage externe, elle est souvent employée en applications locales contre les rhumatismes, et comme antiseptique et cicatrisante sur les plaies (Bouderbala *et al.* 2008). D'autre part, la macération ou l'infusion serait utile pour débarrasser le cuir chevelu des parasites. En plus, elle a un effet antifongique et antimicrobien. Généralement, *Ajuga iva*

possède toutes les propriétés de *Artemisia herba alba* et *Thymus vulgaris* (Bouderbala *et al.* 2008).

3.5. Propriétés biologiques d'*Ajuga iva*

Chenni *et al.* (2007) ont étudié l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* qui diminue les endommagements issus du stress oxydatif chez les rats traités par des doses élevées de cholestérol. Dans le même axe, Bouderbala *et al.* (2008) ont montré que l'extrait aqueux lyophilisé d'*Ajuga iva* peut réduire le stress oxydant et diminuer la péroxydation lipidique chez des rats hypercholestérolémiques. Et comme les flavonoïdes et les iridoïdes ont été isolés de cette plante (Ghedira *et al.*, 1991), il a été suggéré que la défense antioxydante chez les rats hypercholestérolémiques traités par *Ajuga iva* peut être dû à ces composés. Les résultats de El-Hilaly et Lyoussi (2002) et de El-Hilaly *et al.* (2006) suggèrent qu'*Ajuga iva* peut être considérée comme un agent anti-diabétique et hypolipidémique chez l'homme. En 2004, El-Hilaly et ses collaborateurs ont trouvé que l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* a des propriétés vasodilatatrices et est donc considéré comme agent anti-hypertensif. Les études de Pascual-Villalobos et Robledo (1998, 1999) ont montré que l'extrait aqueux d'*Ajuga iva* inhibe la croissance de la larve *Tribolium castaneum* (70-100% de mortalité). Son effet insecticide est aussi étudié contre *Spodoptera frugiperda* et *S. littoralis*. L'ivette a une activité antibactérienne contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Pseudomonas aeruginosa* (Ben Jannet *et al.*, 1999).

4. MODELES ANIMAUX DE L'ARTHRITE

Les modèles animaux d'arthrite, sont utilisés soit pour déterminer les mécanismes physiologiques impliqués dans la pathogénie de l'AR, soit pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et valider des traitements potentiels. Ils présentent de nombreuses caractéristiques analogues à l'AR humaine mais possèdent également des différences. Ainsi, il existe trois critères de sélection d'un modèle animal (Bendele, 2001) :

- La capacité à prédire l'efficacité des agents thérapeutiques chez l'Homme,
- La facilité d'utilisation du modèle (reproductibilité des résultats, durée d'expérimentation),
- La similitude avec la pathogénie humaine.

La majorité des modèles utilisés pour étudier l'AR répondent à ces critères et présentent de telles similitudes avec l'AR humaine qu'ils aident à prédire l'efficacité et potentiellement la toxicité des agents thérapeutiques. Cependant, d'importantes différences existent avec l'AR humaine. En effet, l'arthrite chez les rongeurs progresse très rapidement par rapport à la maladie humaine et par conséquent, elle est caractérisée par une réponse primaire de type inflammation aiguë (Bendele, 2001). De plus, en réponse à l'inflammation articulaire, les souris ont tendance à développer une résorption osseuse beaucoup plus marquée que chez l'homme. Parmi les modèles murins les plus utilisés, on trouve des modèles d'arthrite induite, des modèles transgéniques développant une arthrite spontanée et des modèles knock-out qui ont permis de mettre en évidence le rôle d'une cytokine, d'un récepteur ou d'un facteur de transcription dans la pathogénie de l'AR (Bendele, 2001).

Plusieurs approches ont été développées chez les rats et les souris pour induire l'arthrite soit par immunisation ou par injection. Le modèle d'arthrite induite au collagène (collagen induced arthritis : CIA) est le plus connu et certainement le plus apprécié car il implique l'immunisation avec une composante du cartilage : le collagène (Billiau, Matthys 2011). L'arthrite peut également être induite par transfert passif soit d'anticorps comme les anticorps anti-collagène II (anti-CII) (Terato *et al.*, 1995), soit de sérum arthritogène comme pour le modèle d'arthrite induite au sérum de souris K/BxN (Ditzel, 2004). Le modèle d'arthrite induite aux antigènes (AIA) est un autre modèle d'arthrite où les antigènes peuvent varier (BSA, pristane, protéoglycane, SCW, adjuvant de Freund) et qui permet de mettre en évidence la notion de peptide arthritogène (Di Paola, Cuzzocrea 2008).

4.1. Provocation de l'arthrite chez les rats

4.1.1. Le modèle d'arthrite induite par le collagène

La forte incidence des anticorps anti-CII, particulièrement au cours des premières phases de développement de l'AR, indique que le CII est l'un des auto-antigènes majeurs impliqués dans l'initiation de l'inflammation articulaire (Kim *et al.*, 2004). Etant donné qu'il est exclusivement exprimé au niveau du cartilage articulaire, l'immunité développée à son encontre conduit à la dégradation de ce cartilage. Ce concept a été largement approuvé dans plusieurs études réalisées sur différentes espèces (rat, souris, singe), (Wooley et Chapedelaine, 1987). Ainsi, il est actuellement établi que l'arthrite induite au collagène est un modèle valide et relevant pour l'étude des mécanismes impliqués dans la pathogénie de l'AR (Figure 14). En effet, ce modèle a permis de démontrer que l'auto-immunité au CII permet de développer une arthrite auto-immune caractérisée par une inflammation de la membrane synoviale, une destruction du cartilage articulaire et une érosion osseuse, analogues à l'AR humaine (Cho *et al.*, 2007).

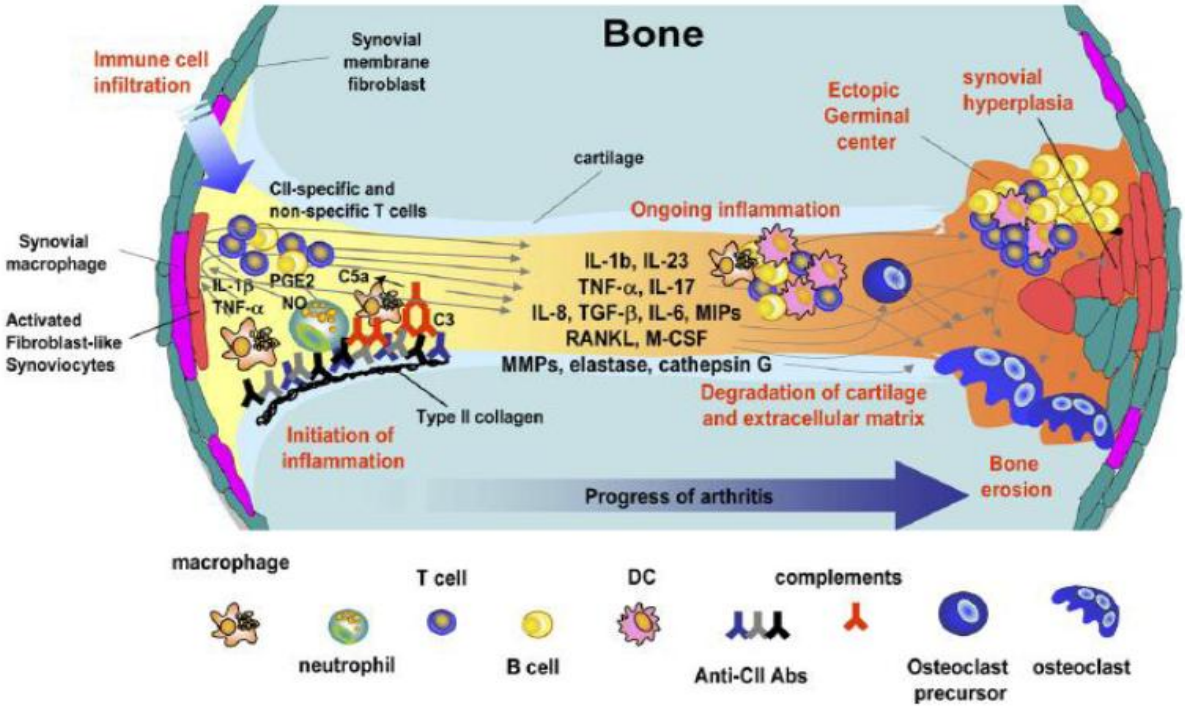


Figure 14 : Schéma de l'inflammation et de la résorption osseuse développée dans le modèle CIA (Cho *et al.*, 2007). **RANKL :** Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, **MMPs**: Matrix Metalloproteinases, **TGF**β **:** transforming growth factor β, **TNF**α **:** tumor necrosis factor α, **MIP** : macrophage inflammatory protein, **M-CSF** : Monocyte Colony-Stimulating Factor.

Depuis la fin des années 1970, c'est le modèle d'arthrite induite par le collagène qui est le plus utilisé que ce soit chez le rat, la souris ou les primates. L'arthrite induite par le collagène chez le rat partage les dispositifs immunologiques et pathologiques de l'AR humaine. Il s'agit d'une arthrite induite par une immunisation avec du collagène de type II (bovin, ovin, humain ou de poulet), protéine abondante dans l'articulation. Une forte réponse lymphocytaire B et T contre cet antigène articulaire est alors induite. Les modifications physiopathologiques incluent une inflammation synoviale avec infiltration de cellules polynucléaires et mononucléaires, la formation d'un panus, l'érosion de l'os et du cartilage ainsi qu'une fibrose (Kim *et al.*, 2004).

Le collagène hautement purifié préparé sous un protocole défini est employé, parce que la présence des contaminants mineurs ou des préparations des protéines déglycosylés donne d'autres rendement ou des résultats faux-positifs ou peut être moins arthritogène (Andersson et Holmdahl, 1990). Les rats injecté avec du collagène type II (du soi) développent également l'arthrite (Stuart *et al.*, 1982) mais le modèle de souris est généralement le plus employé pour son applicabilité dans des espèces génétiquement modifiées.

4.1.2. Arthrite provoquée par les cellules streptococcique

Les composants des parois des cellules bactériennes ont été choisis pour induire l'arthrite dans des souches susceptibles de rongeurs. Le modèle de l'arthrite murine induite par les cellules streptococciques (SCW) chez les rats femelles Lewis est un des modèles expérimentaux les plus fiables et mieux caractérisés des AR (Wilder, 1988). Schwab *et al*. (1970) ont décrit l'arthrite (SCW) et plus tard Schwab et Wilder dans les années 1970 ont séparément caractérisé les dispositifs importants de ce modèle (Kannan *et al.*, 2005). L'arthrite de SCW est induite par une simple injection intra-péritonéale de PGPS préparé à partir des cellules streptococciques. L'inflammation induite a été attribuée à la partie de peptidoglycane (Zhang *et al.*, 2001). Les études par immunofluorescence ont démontré que les fragments des cellules murines sont relativement résistants à la dégradation enzymatiques et peuvent persister pour des semaines et parfois des mois selon la préparation de PGPS utilisé pour l'induction de l'arthrite (Eisenberg *et al.*, 1982). Les SCW induira une arthrite chronique, grave, érosive chez les rats femelles Lewis (Eisenberg *et al.*, 1982 ; Schwab, 1993) alors que les mâles sont moins sensibles à l'induction de l'arthrite. D'autre part, les rats de Fisher et d'autres souches sont résistants à l'arthrite induite par le PGPS. Le mécanisme de la susceptibilité demeure inconnus (Wilder, 1998).

Un rôle dominant des molécules CMH dans la susceptibilité d'arthrite est bien discuté parce que Lewis et Fisher partagent le même CMH de rat, mais diffère dans leur susceptibilité (Schwab *et al.*, 1993). Comme dans l'AR humaine, les rats femelles développent l'arthrite plus aisément que les rats mâles. La susceptibilité élevée des femelles dans l'arthrite de SCW a été initialement pensée être due aux niveaux élevés d'œstrogène dans le sang et ses effets secondaires sur le système réticulo-endothélial. Clairement, d'autres facteurs jouent un rôle important à l'évidence que les rats femelles Fisher ont les niveaux d'œstrogènes sériques comparables aux rats femelles Lewis mais ne développent pas l'arthrite après les injections de PGPS (Calogero *et al.*, 1995 ; Wilder et Allen, 1985). La sévérité de l'arthrite et la persistance des fragments dépend de la source de souche SCW et peut changer avec la série de PGPS et de procédé préparatoire spécifique. L'incidence de l'arthrite aiguë et chronique est approximativement 95% avec une préparation appropriée des fragments de SCW. L'évaluation de l'arthrite peut être effectuée par divers moyens. La plupart des modèles de l'AR se concentrent sur les phases retardes, chronique, auto réactive de l'arthrite. Le modèle SCW, en revanche, donne à des investigateurs une occasion d'examiner des phases aigue et/ou retardée de l'arthrite d'une façon prévisible commençant dans des jours de l'injection du SCW (Schwab *et al.*,1993 ; Kimpel *et al.*, 2002).

4.1.3. Modèle de l'arthrite induite par l'adjuvant

Le premier modèle de l'arthrite rhumatoïde a été développé chez les rats par Stoerk *et al.* (1954) et Pearson et Wood (1959) qui ont constaté que l'injection des rats avec l'adjuvant complet de Freund induit l'arthrite, probablement par un mécanisme impliquant les protéines de choc thermique (heat shock proteins HSP). Ce modèle a été nommé le modèle de l'arthrite provoqué par l'adjuvant (Adjuvant Arthritis : AA). Il a été employé pour tester des nouveaux médicaments contre l'arthrite inflammatoire. Le plus intéressent c'est que les HSP ont été aussi bien impliquées dans la pathogénie de l'AR humaine (Res *et al.*, 1988). Plusieurs études de ce modèle ont soulevé le rôle des lymphocytes, les cellules immunosuppressives, et le type d'antigène administré avec l'adjuvant pour l'induction de l'arthrite (Billingham, 1995). D'autres études ont constaté que l'AA pourrait être induite par l'adjuvant incomplet de Freund (IFA) dans les rats transgéniques DA. ce modèle a été également reproduit chez les souris (Knight *et al.*, 1992). L'arthrite provoquée par l'adjuvant a été employée pour l'évaluation des traitements anti-inflammatoires comme les NSAIDs comme l'aspirine et le phénylbutazone pendant le début des années soixante (Wooley, 1991) et les inhibiteurs de

COX-2 tels que le celecoxib (Geis, 1999). L'AA chez les rats partage beaucoup de dispositions avec l'AR humaine tel que le terrain génétique, les cellules synoviales et les $TCD4^+$ (Goodson *et al.*, 2003).

Enfin, il y a des différences génétiques entre les rats et souris dans la susceptibilité à l'arthrite inflammatoire. Dans certains cas, les réponses changent selon l'antigène utilisé, le protocole d'induction, et les facteurs environnementaux ((Wooley, 2004 ; Griffiths, 1988).

4.2. Provocation de l'arthrite chez les souris

4.2.1. Modèle d'arthrite induite par le collagène

L'arthrite induite par le collagène est un modèle animal de l'AR intensivement étudié parce qu'elle partage les caractères immunologique et pathologiques de l'AR humaine. La CIA est la principale maladie auto-immune des articulations, exigeant des cellules immunitaires T et B contre le collagène II pour la manifestation de la maladie. Des souches murines génétiquement susceptibles (ayant l'haplotype $H-^{2q}$ du CMH de classe II), telles que les souris DBA/1, B10.Q et B10.RIII, sont immunisées une première fois par injection sous-cutanée de CII bovin émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund. Trois semaines plus tard, une seconde immunisation au CII émulsifié dans de l'adjuvant incomplet de Freund permet l'initiation rapide d'une arthrite sévère caractérisée par une forte prolifération des LT $CD4^+$ au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques. Les lésions articulaires développées par ce modèle, où l'arthrite est maintenue pendant 9 semaines, présentent des caractéristiques cliniques (érythème, œdème), histologiques (hyperplasie synoviale, infiltration cellulaire, formation de pannus, destruction du cartilage et de l'os) et immunologiques (fort taux d'anti-CII, production des FR) similaires à l'AR humaine. De plus, comme pour l'AR humaine, plusieurs cytokines pro-inflammatoires sont fortement exprimées dans les articulations des souris arthritiques (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12, IL-17 et IL-23). Contrairement à l'AR humaine, les souris dont l'arthrite est induite au collagène développent une périostite tibiale (inflammation du périoste, membrane fibreuse recouvrant l'os) (Hegen *et al.*, 2008).

Ce modèle a permis de définir l'implication d'un ensemble de facteurs, incluant le CMH de classe II, les LT et les gènes de susceptibilité, dans la pathogénie de l'AR. Il a en effet été montré que la souche murine C57BL/6, ayant l'haplotype $H-^{2b}$ du CMH de classe II peut développer une arthrite sévère avec une forte incidence, de l'ordre de 60-70%. D'un point de vue clinique et histologique, l'arthrite développée ressemble à celle obtenue chez la souche

DBA/1 qui, elle, possède l'haplotype H-^{2q} (Campbell *et al.*, 2000). Par contre, la souche Sv/129, possédant également l'haplotype H-^{2b}, est résistante au développement de l'arthrite induite au collagène. Le répertoire TCR est également important dans ce modèle. Les souches Biozzi H.I et Biozzi H.II, possèdant toutes deux l'haplotype H-^{2q} mais un répertoire TCR différent, sont respectivement, susceptible et résistante au développement de la CIA (De Franco *et al.*, 1995) .

Bien que le mécanisme impliquant les LT dans le développement de la CIA reste encore non élucidé, il est certain que ces cellules sont requises dans le développement de l'arthrite dans ce modèle. Curieusement, le transfert passif de LT de souris CIA à des souris naïves n'induit que des changements mineurs au niveau de l'articulation alors que le transfert de sérum de souris CIA résulte en une inflammation sévère mais transitoire. Le transfert des LT et de sérum à la fois, induit par contre une arthrite chronique (Kannan *et al.*, 2005). Ainsi, même si les LT jouent un rôle prééminent dans la régulation et le développement de la CIA, les autoanticorps dirigés contre le CII murin semblent être à l'origine du mécanisme d'initiation de la pathogénie dans ce modèle. En effet, durant les premiers stades du développement de l'arthrite, les anticorps anti-CII se lient au cartilage articulaire et déclenchent la cascade du complément qui va jouer le rôle de pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Figure 15). Le rôle pathogénique de ces autoanticorps a été révélé par les expériences de transfert passif d'anticorps anti-CII qui permettent le développement d'arthrites sévères même dans les souches résistantes à la CIA (Brand *et al.*, 2003).

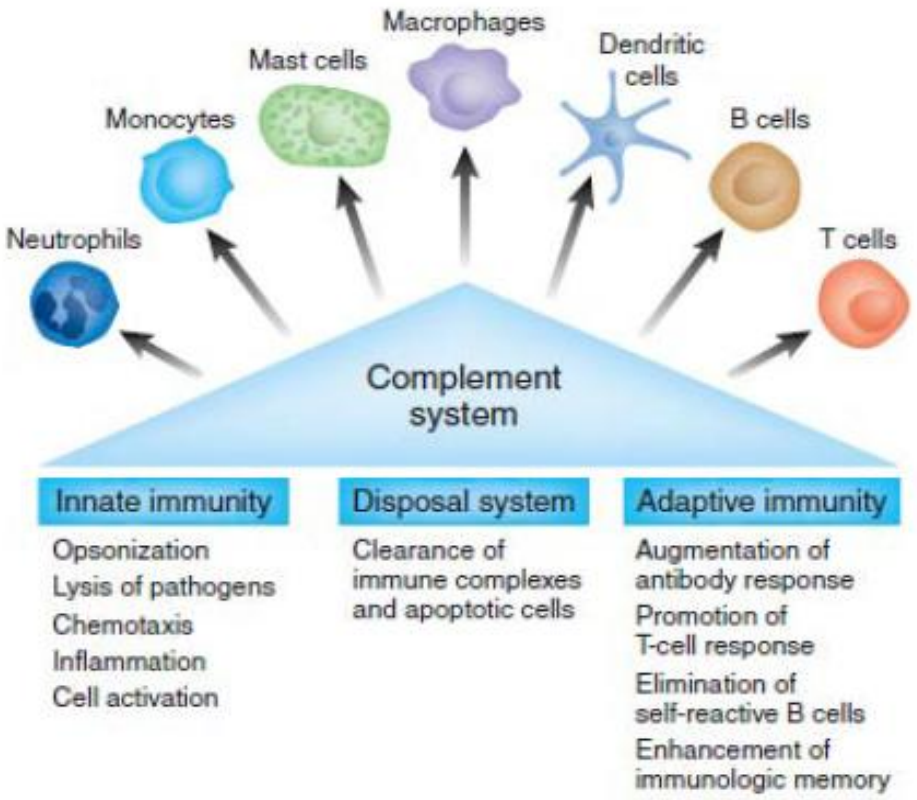


Figure 15 : Le système du complément est un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Ricklin et Lambris, 2007).

4.2.2. Modèles de transfert passif

Un autre modèle d'arthrite impliquant le collagène de type II peut être rapidement établi par injection d'un cocktail d'anticorps monoclonaux anti-CII à des souris. Contrairement à la CIA, ce modèle induit à l'anti-CII développe une arthrite sévère en quelques heures avec une incidence s'approchant de 100%. En effet, en 24 à 48 h, l'arthrite peut être observée. L'inflammation atteint son seuil vers 5-7 jours et persiste pendant 2 semaines. Par conséquent, ce modèle permet d'observer à la fois la phase aiguë et la phase chronique de l'arthrite avant le déclin de la réponse inflammatoire après 3 semaines (Terato *et al.*, 1995).

Le développement d'une arthrite peut être provoqué par l'induction d'une réponse immunitaire par transfert de sérum de souris K/BxN, appelé sérum KRN (Figure 16), correspondant à des autoanticorps anti-glucose-6-phosphate isomérase. Contrairement aux souris K/BxN qui développent une arthrite chronique, l'arthrite induite par transfert de sérum de ces souris est transitoire, montrant une phase de déclin 15 jours après le transfert (Ditzel, 2004). Cependant, l'inflammation peut être maintenue par répétition du transfert de sérum. De

même que pour le transfert d'anticorps anti-CII, le transfert de sérum de souris K/BxN ne requiert pas l'utilisation d'une souche particulière. De plus, il a été montré qu'aussi bien le transfert de sérum que d'IgG purifiées à des souris naïves ou mêmes à des souris déficientes en cellules T ou en cellules B, permet le développement d'une arthrite sévère 24 h après le transfert (Korganow *et al.*, 1999).

Figure 16 : Modèle d'arthrite induite par transfert de sérum de souris K/BxN (**a**) Souris naïves ayant reçu le sérum de souris K/BxN (**b**) Souris naïves ayant reçu le sérum de souris saines (Ditzel, 2004).

Ce modèle a été très utile pour l'étude des mécanismes qui lient la production pathologique d'immunoglobulines et le développement de l'arthrite. En effet, comme l'activité arthritogénique du sérum KRN est spécifique à la fraction IgG, il a été suggéré que les récepteurs FcγR jouent un rôle essentiel dans le développement de la maladie. Le transfert du sérum de souris K/BxN à des souris déficientes en FcγRI, FcγRII et FcγRIII a montré que les deux premiers récepteurs ne sont pas impliqués dans le développement de la maladie alors que le FcγRIII pourrait jouer un rôle (Ji, 2002a).

Ce modèle a également permis de déterminer la cinétique d'expression des différentes cytokines pro-inflammatoires au cours de l'arthrite induite. En effet, l'injection de sérum de souris K/BxN à des souris C57BL/6 montre que toutes les cytokines sont exprimées quelques heures après le transfert mais à des taux modestes. Le TNF-α est la première cytokine qui atteint un pic d'expression en 24 h, suivie par une expression beaucoup plus intense de l'IL-

1β à 48 h. Cette étude a également montré que l'IL-6 est exprimée plus tardivement, à 72 h, et que son expression est transitoire (Ji, 2002b). Le transfert de sérum KRN à des souris C57BL/6 déficientes en IL-6 a permis plus tard de confirmer que l'IL-6 n'a aucun rôle dans le déclenchement de l'arthrite induite puisque les souris *Il-6-/-* développent exactement la même arthrite que les souris sauvages (Ji *et al.*, 2002a).Ceci est en accord avec les observations faites sur le modèle CIA et le modèle d'arthrite induite aux antigènes (van de Loo *et al.*, 1997) mais contredit certaines études réalisées sur le modèle CIA où l'on observe un effet de l'anti-IL-6R sur le développement de la maladie (Takagi *et al.*, 1998 ; Ohshima *et al.*, 1998).

Il a été également montré que la cytokine IL-17 est déterminante pour la sévérité de l'arthrite dans ce modèle ce qui soutient le postulat selon lequel l'AR est une maladie de type Th1/Th17 plutôt qu'une maladie exclusivement de type Th1 (Jacobs *et al*., 2009). Toutes ces caractéristiques font que le modèle d'arthrite induite au sérum de souris K/BxN est un excellent modèle pour l'étude des mécanismes inflammatoires impliqués dans le processus rhumatoïde.

4.2.3. Modèles d'arthrite induite par l'antigène

4.2.3.1. Arthrite induite à la BSA

Ce modèle d'arthrite est obtenu par injection intra-articulaire d'un antigène soluble, la Sérum Albumine Bovine (BSA) méthylée, à une souris précédemment sensibilisée au même antigène émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund. Ceci implique que l'arthrite développée est une réponse immunitaire à cet antigène caractérisée par une activité accrue des cellules présentatrices de l'antigène. Bien que ce modèle montre des similitudes histologiques avec l'AR humaine, incluant une hyperplasie synoviale avec une infiltration prédominante des $TCD4^+$, LB et des macrophages, il reste limité au niveau du développement de la maladie. En effet, l'arthrite se développe uniquement au niveau de l'articulation qui a reçu l'injection et par conséquent, ne présente pas de caractère systémique, contrairement à l'AR humaine (Williams, 1998).

4.2.3.2. Arthrite induite aux adjuvants

Le modèle d'arthrite induite au pristane, initialement développé chez le rat, a permis de définir l'importance des autoanticorps dans le développement de l'AR mais surtout dans le lupus érythémateux disséminé (Satoh *et al.*, 1995). Quant au modèle d'arthrite induite à l'adjuvant de Freund, obtenu par simple injection de l'adjuvant contenant une suspension de *Mycobacterium tuberculosis*, il a été le premier modèle développé chez le rat mais très peu chez la souris.

4.2.3.3. Arthrite induite par les protéoglycanes

Ce modèle est obtenu par injection intra-péritonéale à des souris Balb/c de protéoglycane émulsifié dans un adjuvant de diméthyl-dioctadecylammonium bromide. Le protéoglycane est isolé du cartilage humain obtenu après arthroplasties. Bien que ce modèle ne soit pas des plus communément utilisés, il a permis de définir le profil d'expression de différents gènes au cours des arthrites aiguës et des arthrites chroniques débutantes (Adarichev *et al.*, 2003).

4.2.3.4. Arthrite induite par les streptocoques

Beaucoup plus utilisé chez le rat, ce modèle est obtenu par injection intra-péritonéale d'une suspension de streptocoques, préalablement soumis à une sonication. Cette étape permet de libérer un complexe peptidoglycane-polysaccharide (PGPS) où la fraction PG semble déterminante pour l'induction de l'inflammation (Zhang *et al.*, 2001). Le muramyl di-peptide, représentant la fraction minimale du complexe PGPS a été également utilisé pour induire l'arthrite. Dans les 2 cas, l'arthrite développée paraît aiguë. En effet, ne dépassant pas 7 jours, elle ne présente ni la formation de pannus, ni l'érosion osseuse. Par contre, les similitudes avec l'AR humaine correspondent à l'infiltration de cellules polynucléaires, de LT $CD4^+$ et de macrophages (Williams, 1998). Il a été par ailleurs démontré que la souche Balb/c répond le plus efficacement à cette induction alors que la souche C57BL/6 s'avère résistante (Kannan *et al.*, 2005).

1. MATERIELS

1.1. Matières végétales

La plante *Ajuga iva* a été récoltée au mois de Juin 2010 à partir de la région de Maaza Wilaya de Bordj Bou Arreridj, Est de l'Algérie. La plante a été authentifiée par Pr. Laouer H., Professeur au Département de Biologie Végétale et Ecologie, Université Sétif 1. Les échantillons ont été nettoyés puis séchés à température ambiante dans un endroit aéré à l'ombre, pour mieux conserver les molécules sensibles (figure. 17)

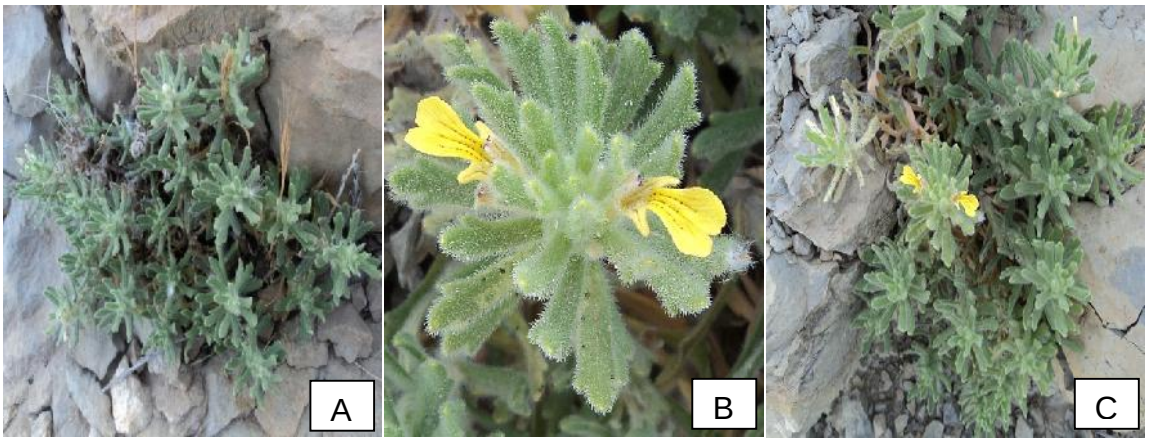


Figure 17: la plante d'*Ajuga iva* recoltée a partir de la région de Maaza 40 Km de sud de Bordj Bou Arreridj (**A**) la plante entière, (**B**) la fleure, (**C**) les feuilles et les fleurs.

1.2. Animaux

Les animaux utilisés sont des rats Albinos *Wistar* mâles et femelles pesant 146,80 ± 20,46 et les souris Swiss (NMRI) ont un poids compris entre 23 et 25 g, ces animaux sont issus de l'Institut Pasteur d'Algérie. Tous les animaux étaient exempts d'organismes pathogènes spécifiques. Les rats sont mis en adaptation une semaine avant l'expérimentation dans l'animalerie du Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Bordj Bouarréridj. Les animaux ont été logés dans des cages avec accès libre à l'eau et à la nourriture (provenant de la société de production des aliments d'animaux, Groupe Avicole El-

Kseur Bejaia). La température était dans l'intervalle de 20 - 24°C et l'humidité relative entre 60-70%, avec un cycle lumière/obscurité de 12/12 h.

1.3. Réactifs

Collagène type II (chickens sternal cartilage), Adjuvant complet et incomplet de Freund proviennent de Sigma, Allemagne. Le réactif (CRP), (SPINREACT), les réactifs pour glycémie, Urée, Créatinine, Tri Glycéride, Cholestérol, GOT, GPT proviennent de (Biomaghreb). L'acide acétique, méthanol, et tous les autres produits proviennent de Prolabo. Tous les produits sont de grade analytique.

2. METHODES

2.1 Extraction de l'*Ajuga iva*

La méthode de Markham (1982) était suivie pour l'extraction des polyphénols en utilisant le méthanol. Suivant cette méthode; 100 g de la poudre d'*Ajuga iva* ont été complétés à 1 litre par le méthanol 85 % dans l'eau distillée. Le mélange a été soumis à une agitation pendant une semaine à température ambiante, puis laissé reposer quelques heures. La fraction flottante a été par la suite filtrée sur laine de verre, puis sur verre fritté N° 03 pour obtenir le filtrat (1). L'extraction a été répétée une deuxième fois où le précipité a été complété à 1 litre par le méthanol 85 % pour obtenir le filtrat (2) qui a été mélangé avec le filtrat (1). Le mélange a été filtré pour la dernière fois sur papier filtre et soumis à une évaporation rotative à 40 °C utilisant un rotavapor ((Büchi 461, Allemagne) pour obtenir l'extrait brut conservé à - 20 °C jusqu'à son utilisation.

2.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* a été effectué selon la méthode au bleu de Prusse (Price and Butler, 1977) modifiée par Graham (1992) pour donner une meilleure stabilité de la couleur. La différence entre la méthode originale et la méthode modifiée réside dans l'utilisation du $FeCl_3$ à la place du $FeNH_4(SO_4)_2$ comme second réactif. Cette technique est basée sur le principe d'oxydation du ferricyanide de potassium, $K_3Fe(CN)_6$ par les polyphénols pour donner les ions ferreux (Fe^{2+}), ces derniers réagissent avec le chlorure de fer ($FeCl_3$) et donne le complexe bleu de Prusse qui absorbe à 700 nm. Brièvement, 0.1 ml de l'extrait dilués dans le méthanol a été ajouté à 3 ml d'eau distillée.

Après agitation, 1 ml du $K_3Fe(CN)_6$ (0.016 M) puis 1 ml du $FeCl_3$ (0.02 M dans HCl 0.1 N) ont été ajoutés successivement avec un intervalle d'une minute. Après 15 minutes, 5 ml de la solution stabilisante (contenant 30 ml de Gomme Arabique 1 %, 30 ml d'acide phosphorique 85 % et 90 ml d'eau distillée) ont été ajoutés et l'absorbance a été mesurée à 700 nm. La concentration des polyphénols totaux a été calculée à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (0 - 200 µg/ml) et exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par grammes du poids sec de l'extrait (mg EAG/g Extrait).

2.3. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes de l'extrait d'*Ajuga iva* ont été quantifiés par la méthode au trichlorure d'aluminium (Bahorun et al, 1996). Un ml de chaque échantillon (préparés dans le méthanol) a été ajouté à 1 ml de la solution d'$AlCl_3$ (2 % dans le méthanol). Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique a été calculée à partir de courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (0 - 40 µg/ml dans le méthanol) et exprimée en milligramme d'équivalent quercétine par gramme du poids d'extrait (mg EQ / g Extrait).

2.4. Provocation de l'arthrite par le collagène type II chez les rats

Les rats sont divisés en six groupes de poids homogènes, chaque groupe contient 10 rats (groupe 1 : témoin négatif, groupe 2 : témoin positif, les groupes 3,4 : pour le traitement préventif et 5,6 : pour le traitement curatif). L'arthrite a été induite chez les rats Albinos Wistar selon une méthode déduite des travaux de Trentham et al. (1977), Rosloniec et al. (1994) et Christina et al. (2008). Le collagène type II de poulet (Sigma) a été dissous dans l'acide acétique 0.1 M (3 mg/ml) pendant 24 h à 4°C. Dans la première immunisation, 100 µL de cette solution ont été émulsifiée avec le même volume d'adjuvant complet de Freund. Le mélange a été immédiatement administré par injection intradermique à la base de la queue et à quatre points sur le dos des rats après anesthésie. Après sept jours de la première immunisation, une 2^{éme} immunisation de rappel de 100 µl du collagène II (2 mg/ml dans l'acide acétique 0.1 M) émulsifiés avec le même volume de l'adjuvant incomplet de Freund ont été injectés de la même façon. Le groupe témoin négatif reçoit 200 µl de l'acide acétique 0.1 M.

2.5. Traitement préventif et curatif par l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva*

Pour l'étude des effets préventifs et curatifs des extraits d'*Ajuga iva*, les rats sont divisés en six groupes :

- Groupes 1 et 2 : injectés par le collagène II et ont reçu, par gavage, 1 ml d'une solution de 30 mg/kg (groupe 1) ou 60 mg/kg (groupe 2), dès la 1ère immunisation jusqu'au 21ème jour.
- Groupe 3 : témoin négatif, injecté par l'acide acétique (200 µl) et non traité,
- Groupe 4 : témoin positif, injecté par le collagène II et non traité,
- Les groupes témoins négatif et positif; les rats ont reçu 1 ml de l'eau distillée par gavage jusqu'au 40ème jour.
- Groupes 5 et 6 : injectés par le collagène II et ont reçu par gavage 1 ml d'une solution de 100 mg/kg (groupe 5) et 150 mg/kg (groupe 6), à partir du 14^{éme} jusqu'au 40^{éme} jour. Il est à noter que le traitement concerne uniquement les rats dont les signes de l'arthrite sont apparus.

2.6. Evaluation des signes cliniques de l'arthrite

Les signes cliniques de l'arthrite évalués par le score arthritique **(**arthritic score) reposent sur la moyenne d'observations de 3 personnes sur l'évolution des signes de l'arthrite chez les rats immunisés. L'arthrite a été quantifiée par le système d'estimation clinique (Larsson et al, 2002). Le score total pour un animal a été calculé en addition des scores des quatre pattes en utilisant une échelle de (0 à 16). L'observation des signes de l'arthrite pour chaque patte est évaluée comme suit (Kanp-Sung et al, 2004):

0 : Pas de gonflement ni rougeur des pattes; aucun changement,

1 : Un gonflement et rougeur dans un type d'articulation,

2 : Un gonflement et rougeur dans 2 types d'articulation,

3 : Un gonflement et rougeur dans 3 types d'articulation,

4 : Un gonflement et rougeur dans 4 types d'articulation.

2.7. Prélèvement du sang

Le sang est recueilli dans des tubes secs et des tubes qui contient l'EDTA (anti coagulant), à partir de la veine du sinus rétro-orbital à l'aide de tubes capillaires. Cette technique est fiable, facile et sans danger. La ponction a été réalisée après anesthésie préalable de l'animal avec le chloroforme (Janssens, 2006).

2.8. La vitesse de sédimentation des globules rouges

La vitesse de sédimentation (VS) est un test pratique pour l'évaluation de l'inflammation. Des échantillons de sang des groupes étaient pris dans des tubes EDTA, le sang est placé verticalement dans des tubes capillaires pendant 2 heures, la vitesse à laquelle les globules rouge sédimente est mesurée, les résultats sont exprimés en mm aux première et deuxième heures (Janssens, 2006).

2.9. Dosage de la protéine C réactive

Les échantillons de sang prélevés dans des tubes secs subissent une centrifugation de 4000 tours/min pendant 30 minutes (centrifugeuse Sigma 2-16PK). Le sérum récupéré est utilisé pour la recherche des paramètres sérologiques de l'inflammation. Une aliquote de 50 µl de sérum non dilué a été déposée sur une lame, puis 50 µl du réactif CRP-latex (Spinreact) ont été ajoutés. Les deux gouttes sont mélangées à l'aide d'un agitateur pendant 2 minutes avant d'observer la présence de l'agglutination. Les contrôles positifs et négatifs doivent être traités de la même façon que le sérum à examiner (Lars et al, 1997). Si une agglutination est obtenue, une série de dilution du sérum était réalisée : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, avec l'eau physiologique et la même procédure est effectuée avec chacune des dilutions. Le taux de la protéine C réactive dans le sérum est obtenu en multipliant l'inverse de la dernière dilution ayant donné une réaction positive. La sensibilité de cette méthode est de l'ordre de 6 ug/ml (Grandjean et al, 2006).

2.10. La numération formule sanguine

La numération-formule sanguine (FNS) ou hémogramme permet de mesurer le nombre d'éléments de chacune des trois catégories de cellules sanguines qui sont les globules rouges (hématies), les globules blancs (leucocytes) et les plaquettes. Le sang prélevé et recueilli dans des tubes renfermant de l'EDTA. Pour éviter la coagulation du sang des mouvements répétés

de renversement du tube ont été effectués. La numération des différents éléments figurés du sang et la formule sanguine leucocytaire se fait de façon automatisée. Les analyses sont effectuées au niveau du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Bouzidi Lakhder de Bordj Bou Arreridj à l'aide d'un automate (ERMA PCE 210).

2.11. La réalisation des coupes histologiques

Après 40 jours, les rats sont sacrifiés après anesthésie par le chloroforme ; les pattes postérieures et antérieures sont coupées au-dessus de la cheville et les poignets respectivement. La peau des pattes est enlevée, ensuite les pattes sont fixées dans 10 % de formol pendant une semaine (Amany et al, 2012), puis la décalcification est effectuée avec l'acide formique 10% (Cascão et al, 2012).

2.11.1. Préparation des blocs

Les fragments des pattes sont déshydratés par submersion dans des bains successifs d'éthanol 60 %, 70 % ,80 %, et 100 %, puis éclaircies dans deux bains de toluène de 20 min. Après déshydratation par l'éthanol, les échantillons subissent deux bains de xylène et deux autres de paraffine fondue. Le xylène occupe la place de l'eau et donc facilite la pénétration de la paraffine puisque cette dernière est hydrophobe. La durée de chaque bain est de 24 heures. Les échantillons sont placés dans des moules (barres de Leucart) et recouverts de paraffine fondue. Après refroidissement, les blocs sont prêts à la coupe.

2.11.2. Réalisation des coupes, coloration et observation

Les blocs sont placés dans le microtome afin de réaliser des coupes de 4 µm d'épaisseur. A l'aide d'une pince très fine, les coupes sont placées sur des lames couvertes de gélatine puis déparaffinées par chauffage à l'étuve pendant une heure. Pour mettre en évidence les articulations, les coupes sont d'abord réhydratées par submersion dans les bains suivants : 2 bains de toluène (30 min) puis 5 bains successifs d'éthanol 100 %, 90 %, 80 %,70 %, 60 % (5 min chacun). Après rinçage avec de l'eau distillée, les coupes sont placées dans un bain d'hématoxyline (8 min), l'excès de colorant est enlevé par l'acide chlorhydrique. Elles sont ensuite mises dans un bain d'éosine (8 min) pour colorer le cytoplasme, l'excès du colorant est éliminé par l'éthanol. Les lames ainsi colorées sont couvertes de lamelles et sont alors prêtes à l'observation au microscope. La lecture des lames est effectuée par Dr Khadara Amine spécialiste en Cytologie et Anatomie-Pathologique Bordj BouArréridj.

3. ETUDE DE L'EFFET TOXIQUE DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE D'*AJUGA IVA*

3.1. Toxicité aiguë chez les souris

Pour réaliser le test de la toxicité aigue des souris albinos mâles et femelles issues de l'Institut Pasteur d'Algérie, ayant un poids compris entre 23 et 25 g ont été utilisées. Tous les animaux étaient de statut sanitaire EOPS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiques). Les souris sont mises en adaptation une semaine avant l'expérimentation dans l'animalerie du Département des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Bordj Bou Arréridj). Dix souris par groupe (5 males et 5 femelles) ont été logées dans des cages séparées, avec accès libre à la nourriture et l'eau. Les souris ont été maintenues à température dans l'intervalle 20-24°C et l'humidité relative est entre 60-70 %, sous un cycle de lumière/obscurité de 12/12 h.

Pour l'étude de l'effet toxique éventuel, l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* a été dissout dans l'eau distillée et administré oralement à des doses de (0, 2, 4, 6, 10 et 14 g/kg de poids corporel) ou par voie intra-péritonéale à des doses de (0, 2, 3 , 4, 5, et 6 g/kg de poids corporel). Les souris ont été jeûnées durant la nuit avant l'administration de l'extrait. Le comportement général des souris était surveillé pour la première heure après l'administration, et périodiquement pendant les 24 premières heures, et tous les jours pendant 14 jours. A la fin de l'expérience tous les animaux étaient tués par inhalation de chloroforme, et les organes essentiels (foie, cœur et cerveau) ont été prélevés, pesés et macroscopiquement examinés (Ghosh, 1984).

3.2. Toxicité subaigüe chez les rats

Pour l'étude de la toxicité subaigüe chez les rats Albinos Wistar males et femelles à 8 semaines d'âge pesant entre 150 à 200 g sont issues de l'Institut Pasteur d'Algérie. Tous les animaux étaient de statut sanitaire EOPS (Exempts d'organismes pathogènes spécifiques). Les rats sont mis en adaptation une semaine avant l'expérimentation dans l'animalerie du département des sciences de la nature et de la vie. Dix rats par groupe (5 males et 5 femelles) ont été logés dans des cages sépares, avec accès libre à la nourriture et à l'eau. Les rats ont été maintenus à température dans l'intervalle 20- 24°C et l'humidité relative est entre 60-70%, sous un cycle de 12/12h lumière/obscurité.

L'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* a été dissous dans l'eau distillée et administré quotidiennement par voie orale pendant 90 jours à des doses de 0, 100, 300 et 600 mg/kg de poids corporel. Tous les rats ont été anesthésiés par inhalation de chloroforme et les échantillons du sang ont été récupérés par piqûre du sinus retro-orbital dans des tubes secs et des tubes contenant l'EDTA pour des analyses biochimiques et hématologiques, respectivement (Petterino et Argentino-Storino, 2006). A la fin des 90 jours tous les rats ont été anesthésiés sous l'inhalation de chloroforme. Après le prélèvement du sang, les rats ont été tués par décapitation. Les organes essentiels ont été prélevés, pesés, macroscopiquement examinés puis fixés dans le formol 10 % pour des études histopathologiques (Petterino et Argentino-Storino, 2006).

3.2.1. Évaluation des paramètres hématologiques et biochimiques

3.2.1.1. Évaluation des paramètres hématologiques

Des tests hématologiques et biochimiques ont été effectués au niveau du Laboratoire de Central au Centre Hospitalo-Universitaire de Sétif. L'analyses hématologiques était effectuée à l'aide d'un Coulter (Laboratoires Abbott, IL, Etats-Unis).

3.2.1.2. Évaluation des paramètres biochimiques

a. Dosage du glucose sérique

En présence de la glucose oxydase, le glucose est oxydé en acide glucuronique et peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène réagit en présence de la peroxydase, du phénol et de la 4-aminoantipyrine pour former une solution colorée de quinoneimine (Réaction de Trinder's). L'intensité de la couleur rose formée dans le milieu réactionnel est proportionnelle à la concentration en glucose. Le dosage est effectué en ajoutant 10 µl d'échantillon ou de glucose standards (mg/ml) à 1 ml de réactif et en incubant le mélange pendant 20 min à 25°C. La lecture de l'absorbance de l'échantillon et du standard contre le blanc est ensuite effectuée à 505 nm. La concentration du glucose dans chaque tube a été calculée à partir de la formule :

$$\text{Concentration du glucose (mg/ml)} = (A_{\text{échantillon}} / A_{\text{standard}}) \times C_{\text{standard}}$$

où $A_{\text{échantillon}}$: l'absorbance de l'échantillon, A_{standard} : l'absorbance de standard à 505 nm et C_{standard} est la concentration du glucose standard

b. Dosage des triglycérides sériques

Sous l'action des lipases, les triglycérides sont hydrolysés en glycérol. Le glycérol sera ensuite transformé en peroxyde d'hydrogène sous l'action successive de la glycérol-kinase (GK) et de la glycérol-3-phosphate oxydase (GPO). La quinonéimine qui sert d'indicateur (teinte rouge) se forme à partir du peroxyde d'hydrogène, de la 4-aminoantipyrine et du 4-chlorophénol sous l'action catalytique de la peroxydase. La concentration de triglycéride dans chaque tube a été calculée par la formule :

$$\text{Concentration de triglycérides (mg/mL)} = (A_{\text{échantillon}} / A_{\text{standard}}) \times C_{\text{standard}}$$

où : $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de l'échantillon à 500 nm, A_{standard} est l'absorbance de standard à 500 nm et C_{standard} est la concentration de standard

c. Dosage du cholestérol sérique

Le cholestérol est présent dans le sérum sous deux formes : la forme libre et la forme estérifiée. La forme estérifiée peut être hydrolysée par le cholestérol estérase pour donner la forme libre. Le cholestérol libre est mesuré après oxydation par le cholestérol oxydase à l'issu de laquelle il ya formation du peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène à son tour réagit avec le phénol pour former la quinoneiminune de teinte rouge. L'intensité de la teinte formée est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans le milieu réactionnel. La quantité de quinoneimine formée est proportionnelle à la concentration de cholestérol. La concentration de cholestérol dans chaque tube a été calculée par la formule :

$$\text{Concentration du cholestérol (mg/ml)} = (A_{\text{échantillon}} / A_{\text{standard}}) \times C_{\text{standard.}}$$

où $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance de l'échantillon à 500 nm, A_{standard} est l'absorbance de standard à 500 nm et C_{standard} est la concentration de standard

d. Dosage de l'urée sériques

L'urée est hydrolysée en présence de l'eau et de l'uréase, pour produire l'ammoniac et de dioxyde de carbone. Dans la réaction modifiée de Berthelot (1959), l'ion ammonium peut réagir avec l'hypochlorite et le salicylate pour former une teinte de couleur verte. L'augmentation de l'absorbance à 578 nm est proportionnelle à la concentration de l'urée dans le milieu.La concentration de l'urée dans chaque tube a été calculée par la formule :

$$\text{Concentration de l'urée (mg/ml)} = (A_{\text{échantillon}} / A_{\text{standard}}) \times C_{\text{standard.}}$$

où : $A_{échantillon}$ est l'absorbance de l'échantillon à 580 nm, $A_{standard}$ est l'absorbance de standard à 580 nm et $C_{standard}$ est la concentration de standard

e. Dosage de la Créatinine sérique

La créatinine forme en présence d'une solution de picrate, en milieu alcalin, un complexe rouge-orange; L'absorbance du mélange étant proportionnelle à sa concentration en créatinine dans le milieu réactionnel. A 1 ml d'hydroxyde de sodium sont ajoutés 50 µl d'échantillon ou de créatinine standard puis incubés pendant 5 mn à 20-25 °C. Enfin, 250 µl d'acide picrique sont ajoutés et l'absorbance est mesurée à 500 nm puis une deuxième lecture et effectuée après deux minutes. Après avoir mesuré les différentes absorbances des échantillons (blanc et tests), la différence des 2 mesures a été calculée suivant la formule :

$$\Delta A \text{ de l'échantillon} = [(A2\text{-}A1) \text{ des échantillons}) - [(A2\text{-}A1) \text{ du blanc}]$$

$$\Delta A \text{ du standard} = [(A2\text{-}A1) \text{ du standard}] - [(A2\text{-}A1) \text{ du blanc}]$$

Ensuite, la concentration de la créatinine dans chaque tube a été calculée par la formule :

Concentration de la créatinine (mg/mL) = $\Delta A_{échantillon} / \Delta A_{standard}$ x (standard) (mg/mL)

f. Dosage de l'aspartate aminotransférase

Les transaminases (aspartate aminotransférase : ASAT) catalysent le transfert du groupement amine de l'aspartate sur l'α-cétoglutarate pour former l'oxaloacétate. Dans un milieu réactionnel, le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité aspartate aminotransférase dans l'échantillon. La solution de travail est constituée en mélangeant chaque flacon de R1 (Tris 80 mM, L-Aspartate 200mM pH 7.8) avec un flacon de R2 (NADH 0.18 Mm, Lactate déshydrogénase,LDH 800 U/l, malate déshydrogénase 600 U/l, Oxoglutarate 12 Mm). Cette solution de travail est stable 7 jours à 2-8°C. Ajouter à 3 ml de la solution de travail à 25°C, 300 µl de la solution échantillon. Mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minutes à 340 nm. La concentration des ASAT (anciennement appelée serum Glutamate Oxaloacetate Transaminase : SGOT) est donnée la formule : ΔDO/min x 1750 = U/l. Si la ΔDO/min à 340 nm est supérieure à 0.15, répéter le test en diluant l'échantillon au 1/10 avec une solution de NaCI à 9 g/l et multiplier le résultat par 10.

g. Dosage de l'Alanine Amino Transférase

Les transaminases alanine aminotransaminases (ALAT) anciennement appelée serum glutamic pyruvic transaminases (SGPT) catalysent le transfert du groupement amine de l'Alanine sur l'α-cétoglutarate pour former le pyruvate et le glutamate. Le taux de diminution de la concentration en NADH est directement proportionnel à l'activité aspartate aminotransferase dans l'échantillon. Reconstituer chaque flacon R2 (NADH 0.18 mM, LDH 1200 U/l, Oxoglutarate 15 mM) par un flacon R1(Alanine 500 mM, Tris 100 mM pH 7.5) cette solution de travail est stable 7 jours à 2-8°C. A un volume de 3 ml de la solution de travail (25°C) sont ajoutés 300 µl de la solution échantillon. Incuber à 25°C pendant 1 mn puis mesurer la diminution de la densité optique par minute pendant 1 à 3 minutes. La concentration des ALAT est donnée par la formule: ΔDO/min x 1750 = U/l. Si la ΔDO/min à 340 nm est supérieure à 0.15, répéter le test en diluant l'échantillon au 1/10 avec une solution de NaCI à 9 g/l et multiplier le résultat par 10.

3.3. Test de l'effet sur la reproduction

L'extrait de l'*Ajuga iva* est administré à une dose de 600 mg/kg à un lot traite qui contient 5 mâles et 5 femelles. L'administration aux mâles est effectuée sur une période de quatre semaines. Cette période de quatre semaines couvre une période minimale de deux semaines avant et au cours de la période d'accouplement et une période approximative de deux semaines après l'accouplement. A la fin de cette période les rats sont tués et les testicules sont pesés, fixés dans une solution de Bouin (formol / acide picrique / acide acétique), puis analyses par des coupes histopathologiques.

La dose administrée aux femelles est de 600 mg/kg pendant toute la durée de l'étude 40 jours, c'est-à-dire deux semaines avant l'accouplement plus, la durée de la gestation et au moins quatre jours après la gestation. Au cours de la période d'administration des doses, les animaux sont soigneusement observés à un rythme quotidien pour déceler tous les signes de toxicité. Les nouveau-nés sont pesés et macroscopiquement observes sur les signes de malformation congénitale.

3.4. Analyse statistique

Tous les résultats obtenus ont été exprimés sous forme de moyenne ± écart-type. Le test *t* de Student est utilisé pour comparer les moyennes. Les valeurs de probabilité $p < 0,05$ ont

été considérées statistiquement significatives. Tous les résultats ont été analysés en utilisant un logiciel d'analyse statistique Origin version 7.5.

1. COMPOSITION DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE *D'AJUGA IVA* EN COMPOSES PHENOLIQUES

L'extraction par le méthanol à partir de la poudre de la plante *Ajuga iva* était avec un rendement de l'ordre de 15 %. Le dosage des polyphénols totaux par la méthode au bleu de Prusse montre une reproductivité puisque l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration de l'acide gallique utilisé dans la gamme d'étalonnage, $R^2 = 0.987$ (Figure 18). Les résultats de dosage de polyphénols révèlent que l'extrait methanolic d'*Ajuga iva* contient 186.3 mg d'équivalent d'acide gallique/g de poids sec.

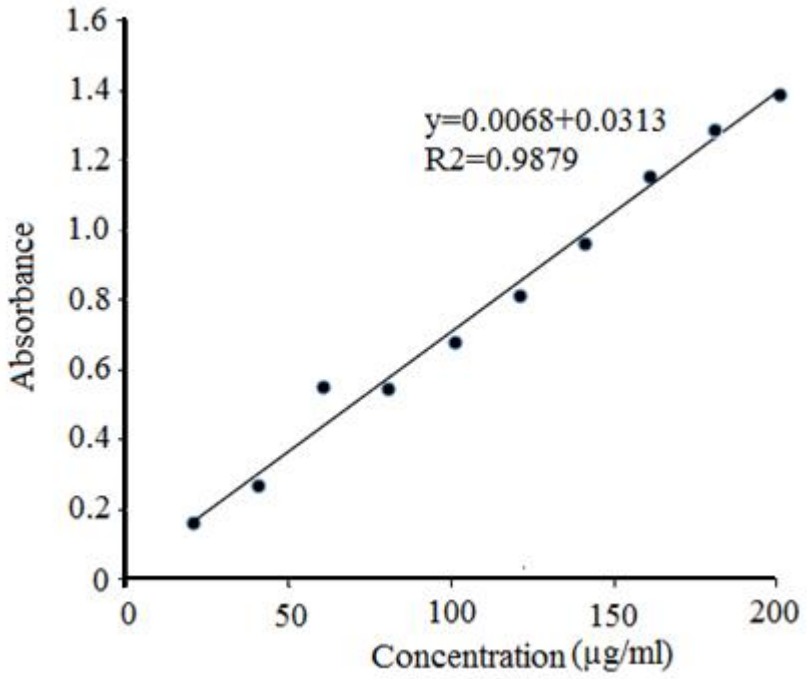


Figure 18: Droite d'étalonnage de l'acide gallique. Chaque point représente la moyenne de trois déterminations.

L'évaluation quantitative des flavonoïdes montre que leur teneur dans l'extrait méthanolique est de 34.46 mg d'équivalent quercétine / g de l'extrait sec. Elle est déterminée à partir d'une droite d'étalonnage réalisée avec la quercétine qui montre une corrélation étroite entre la concentration de ce flavonoïde (1 à 40 µg/ml) et l'absorbance avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0.999$ (Figure 19).

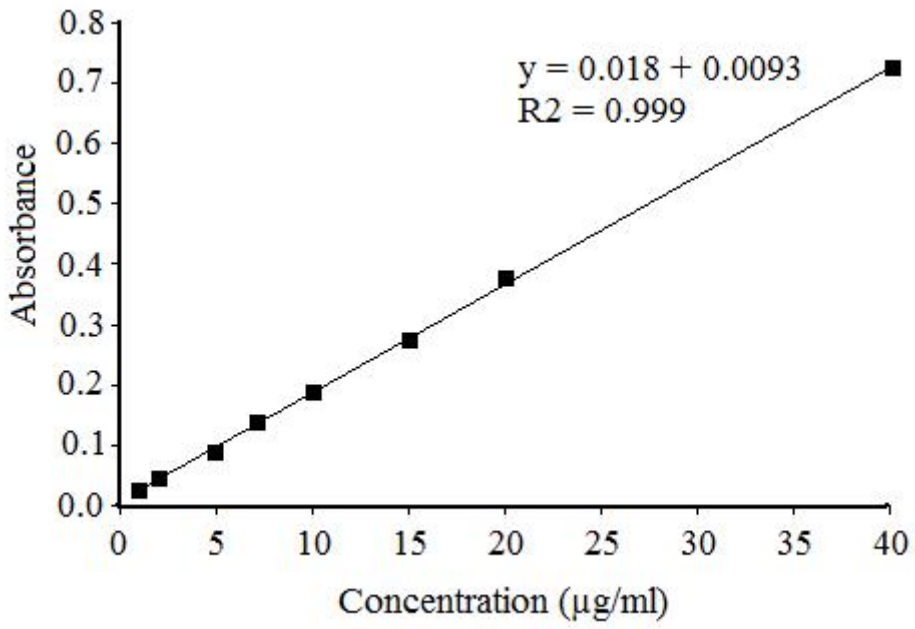


Figure 19: Droite d'étalonnage de la quercétine. Chaque point de la courbe représente la moyenne de trois déterminations.

2. EFFET DE L'EXTRAIT D'*AJUGA IVA* SUR LES SIGNES CLINIQUES DE L'ARTHRITE

2.1. Provocation de l'arthrite chez le rat Wistar

L'arthrite est induite chez les rats Albinos Wistar par l'injection d'une dose de collagène type II avec une injection de rappel après sept jours. Un pourcentage de 90 % des animaux immunisés par le collagène type II (le groupe témoin positif) ont montré des signes de l'arthrite ; gonflement et rougeur des pattes après 14 jours (Figure 20). Les signes cliniques de l'arthrite touchent premièrement les pattes inférieurs puis les pattes supérieurs. La sévérité de l'arthrite est évaluée par le score arthritique : Score 0, pas de gonflement ni rougeur des pattes; Score 1, gonflement et rougeur d'une articulation, Score 2, gonflement et rougeur de 2 articulations, Score 3, gonflement et rougeur de 3 articulations ; Score 4, gonflement et rougeur de 4 articulations.

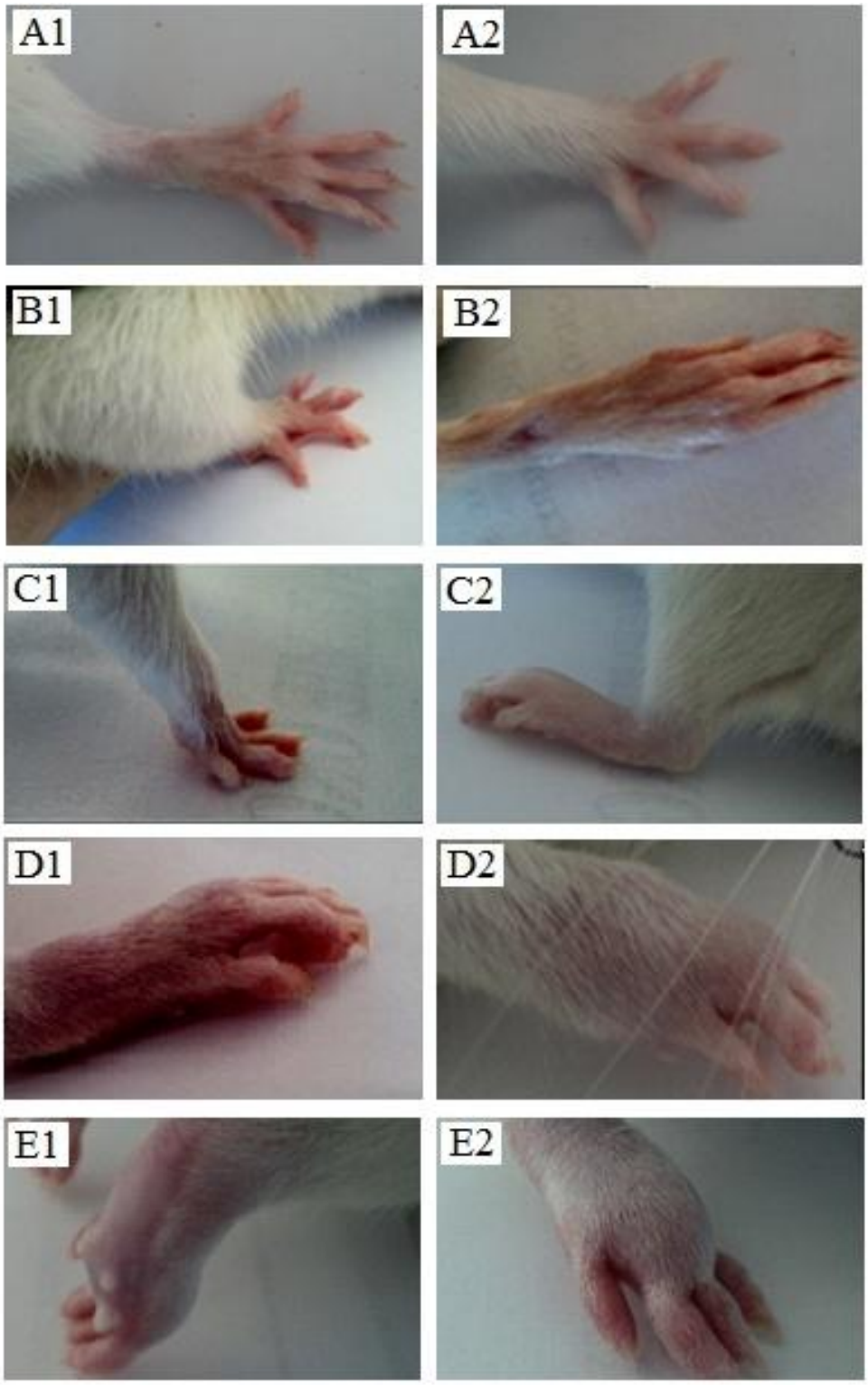


Figure 20: Les signes cliniques de l'arthrite observés après 21 jours de l'induction de l'arthrite par le collagène type II. A : Score 0, B: Score 1, C : Score 2, D : Score 3, E : Score 4. 1 : patte antérieures, 2 : patte postérieure.

2.2. Effets préventifs de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva*

2.2.1. Effets sur le score de l'arthrite

Le traitement préventif par l'extrait d'*Ajuga iva*, en utilisant deux doses (30 et 60 mg/kg) à partir du premier jour de l'induction de l'arthrite (1ère immunisation), n'a pas empêché l'atteinte par la maladie, mais a retardé l'apparition des signes cliniques. En effet, ces signes apparaissent le 11ème jour pour le groupe positif mais le 13ème jour pour les groupes préventifs 1 et 2. De plus, la sévérité de l'affection est diminuée par rapport au témoin positif, comme il est montré dans la Figure 21. Egalement, l'incidence de l'arthrite (le taux des rats arthritiques) le 14ème jour après la 1ère immunisation, est estimée à 50 et 40 % pour les groupes préventifs 1 et 2, respectivement. Ces taux sont nettement inférieurs à celui remarqué chez le groupe témoin positif qui a une incidence de 90 %. Cependant, dans le dernier jour du traitement préventif (21 jours), l'incidence était 70 % dans le groupe 1 et 60 % dans le groupe 2, restant toujours inférieurs en comparaison avec le témoin positif.

Le traitement préventif a diminué la sévérité des signes cliniques de l'arthrite. Le score arthritique dans le 14ème jour était de 2.37 ± 1.87 et 1.28 ± 0.89 chez les groupes traités par les doses 30 et 60 mg/kg, respectivement. Le groupe non traité a un score de 7 ± 2.57. Par ailleurs, dans le dernier jour du traitement préventif, le score arthritique est de 5.85 ± 2.44 et 4 ± 2.85 pour les groupes préventifs 1 et 2, respectivement alors que le témoin positif a un score de 8.14 ± 4.4 (Figure 21).

Le nombre des pattes touchées par l'arthrite est un élément important pour l'évaluation de la sévérité de l'arthrite. Le nombre des pattes arthritiques dans le 14ème jour après la 1ère immunisation était 2.0 ± 1.5 pour le groupe 1 et 1.28 ± 0.89 pour le groupe 2, alors qu'il était 3.42 ± 0.81 chez le groupe témoin positif. A la fin du traitement prophylactique (21 jours) le nombre moyen des pattes arthritiques a été diminué de 2.71 ± 1.18 dans le groupe témoin positif à 2.00 ± 1.14 et 1.54+1.32 dans les groupes préventifs traités avec les doses 30 et 60 mg/kg.

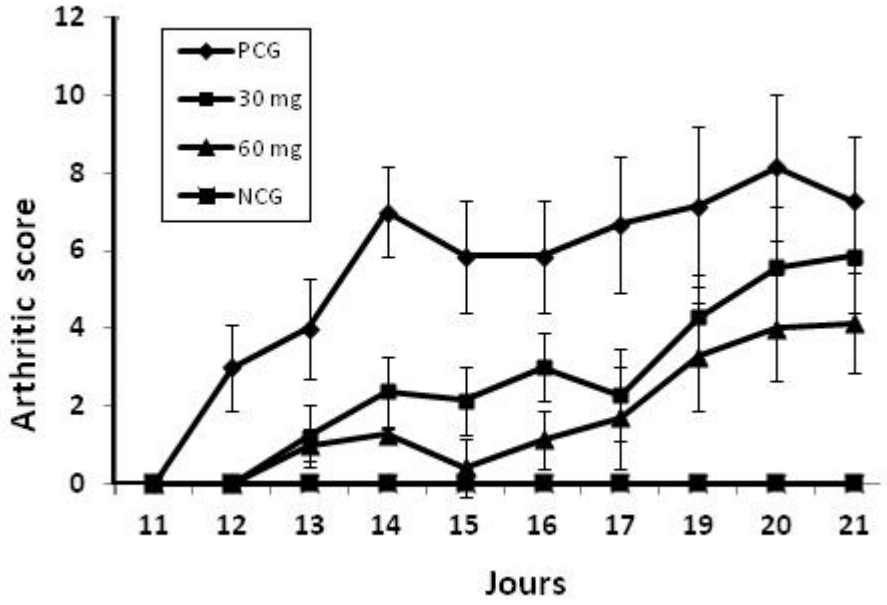


Figure 21: Le développement des signes cliniques (arthritic score) chez les rats (Albinos Wistar), des groupes préventifs traités par les doses 30 et 60 mg de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva*/kg de poids corporel de rat; (n =10). PCG: positive control group, NCG: negative control group.

2.2.2. Effet de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* sur le poids corporel

Dans le groupe témoin positif, les rats ont graduellement perdu leur poids corporel après 14 jours de la première immunisation ($P < 0.01$), en comparaison avec le groupe témoin négatif qui gagne du poids. L'extrait d'*Ajuga iva* n'a pas affecté la perte du poids corporel bien qu'il ait efficacement amélioré les signes cliniques de l'arthrite (Figure 22).

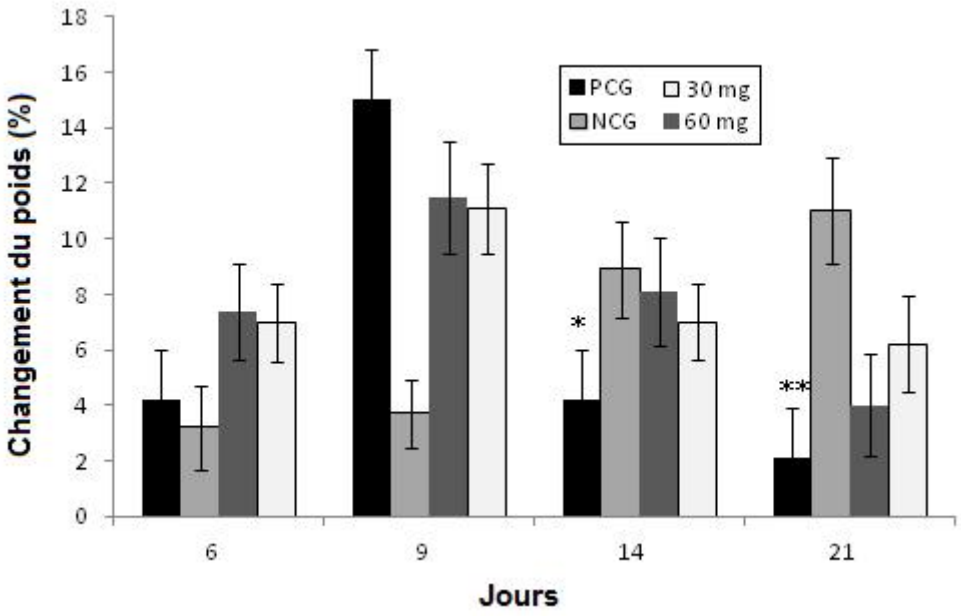


Figure 22 : Changement du poids corporel en fonction de temps chez les groupes préventifs traités par les doses 30 et 60 mg de l'extrait méthanolique d'*A. iva*/kg de poids corporel de rat, Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. *P<0.05, ** P<0.01: variation significative par comparaison avec les rats du lot témoin. (PCG: positive control group, NCG: négative control group).

2.2.3. Effet sur la vitesse de sédimentation

L'inflammation s'est répercutée sur la vitesse de sédimentation des globules rouges qui augmente légèrement dès la déclaration de l'arthrite au 14^{éme} jours. Les rats du groupe témoin positif ont montré un niveau plus élevé de vitesse de sédimentation par rapport au témoin négatif $P < 0.05$. L'extrait d'*A. iva* 30 et 60 mg/kg a remarquablement réduit la vitesse de sédimentation après 14 et 21 jours (Figure 23).

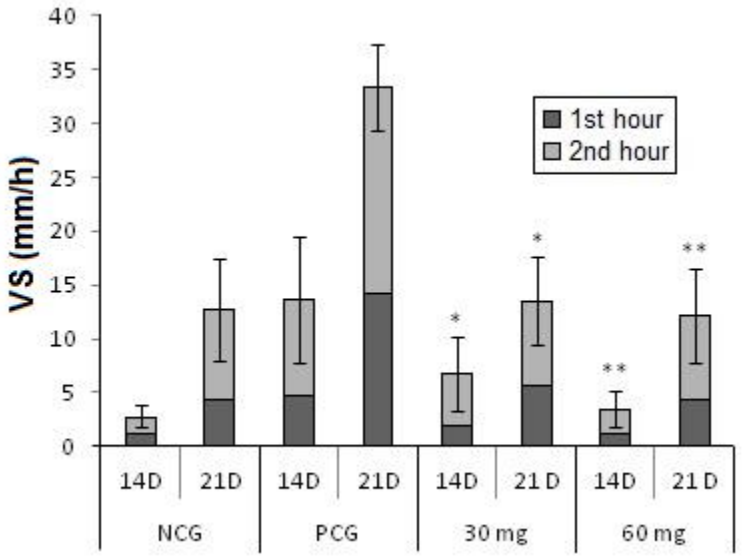


Figure 23 : Vitesse de sédimentation (VS) des groupes préventifs traités par les doses 30 et 60 mg de l'extrait méthanolique de l'*A. iva*/kg de poids corporel de rat. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001. PCG: positive control group, NCG: negative control group.

2.2.4. Effet de l'extrait d'*Ajuga iva* sur la CRP

Après 14, 21 jours de la 1ère immunisation, des échantillons du sang étaient pris dans des tubes secs pour les groupes préventifs, la protéine C réactive a été détectée par des anticorps anti-protéine C. Les rats de groupe témoin positif ont montré un niveau plus élevé de la protéine C dans leurs sérum par rapport au témoin négatif (p<0.001). L'extrait d'*Ajuga iva* 30 et 60 mg/kg a remarquablement réduit de manière significative le taux de la protéine C dans le sérum après 14 jours (P< 0.01), (Figure 24).

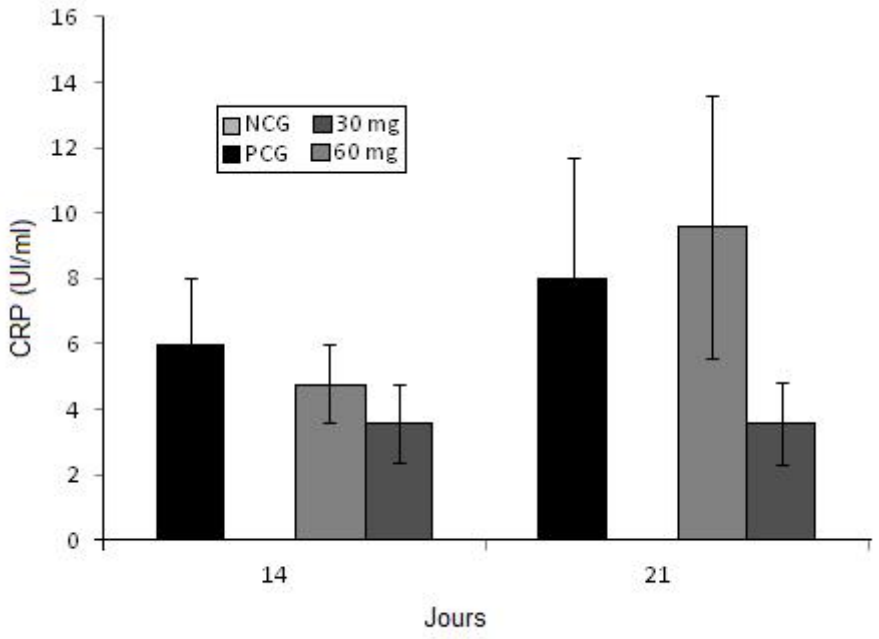


Figure 24 : Le taux de la protéine C réactive dans le sérum des rats des groupes préventifs traités par les doses 30 et 60 mg de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva*/kg de poids corporel de rat. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. *P<0.05, ** P<0.01. PCG: positive control group, NCG: negative control group.

2.2.5. Dénombrement des globules blancs

Le nombre des leucocytes est un paramètre très important pour l'évaluation de la sévérité l'arthrite. Après 14, et 21 jours des échantillons du sang ont été prélevés dans des tubes renfermant de l'EDTA et le nombre des leucocytes est évalué par un automate. Une diminution du nombre des leucocytes a été remarquée chez les rats traités (préventif), par rapport au lot témoin positif dans le 21^{éme} jour (Figure 25). Le nombre des leucocytes à la fin de traitement prophylactique (le 21ème jour après la 1ère immunisation) était de 7.68 ± 1.68 pour le groupe 1 et 7.61 ± 1.8 pour le groupe 2, alors qu'il était 9.47 ± 1.82 chez le groupe témoin positif (Figure 25).

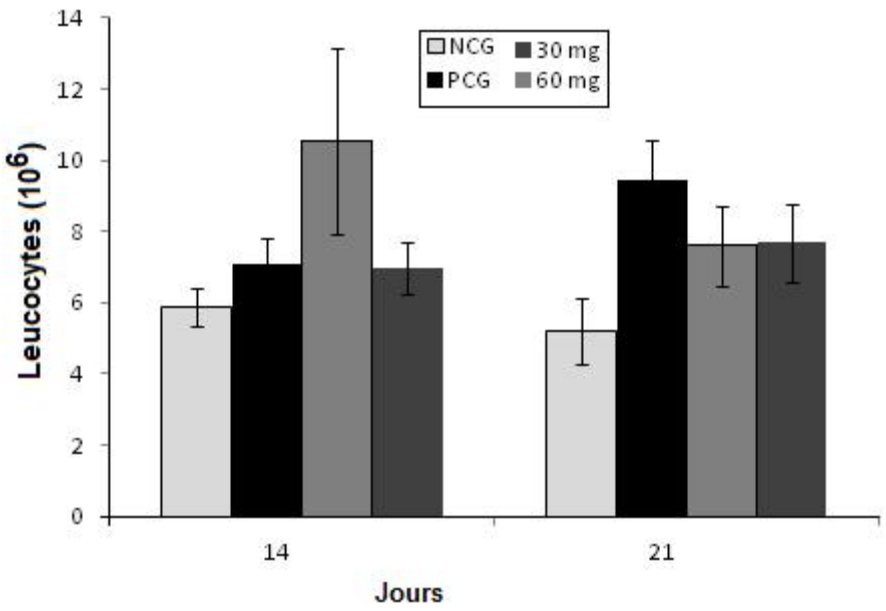


Figure 25 : Le nombre des leucocytes dans le sang des rats des groupes préventifs traités par les doses 30 and 60 mg de l'extrait méthanolique de *l'A. iva*/kg de poids corporel de rat. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart-type (n=10). PCG: groupe témoin positif, NCG: groupe témoin négatif.

2.2.6. Effet d'*Ajuga iva* sur les changements histologiques

Les pattes supérieurs et inférieurs des rats ont été enlevé et fixé dans le formol 10%, à la fin de l'expérience, puis décalcifier dans l'acide formique 15% ; des sections de 4 micromètre d'épaisseur ont été effectué avec le microtome puis, coloré avec l'hématoxyline éosine. Des changements histologiques ont été évalués, les articulations des rats ont présenté une infiltration des granulocytes et mononucléaires, ce qui donne une hyperplasie synovial, avec la formation d'un pannus inflammatoire, la perte de cartilage articulaire et l'érosion de l'os subchondral en comparaison avec le groupe normal (Figure 26 A et B).

Le traitement préventif par l'extrait d'*Ajuga iva* a montré des effets bénéfiques sur ces dernières manifestations pathologiques où on n'a observé aucun signe de l'inflammation (Figure 26 D).

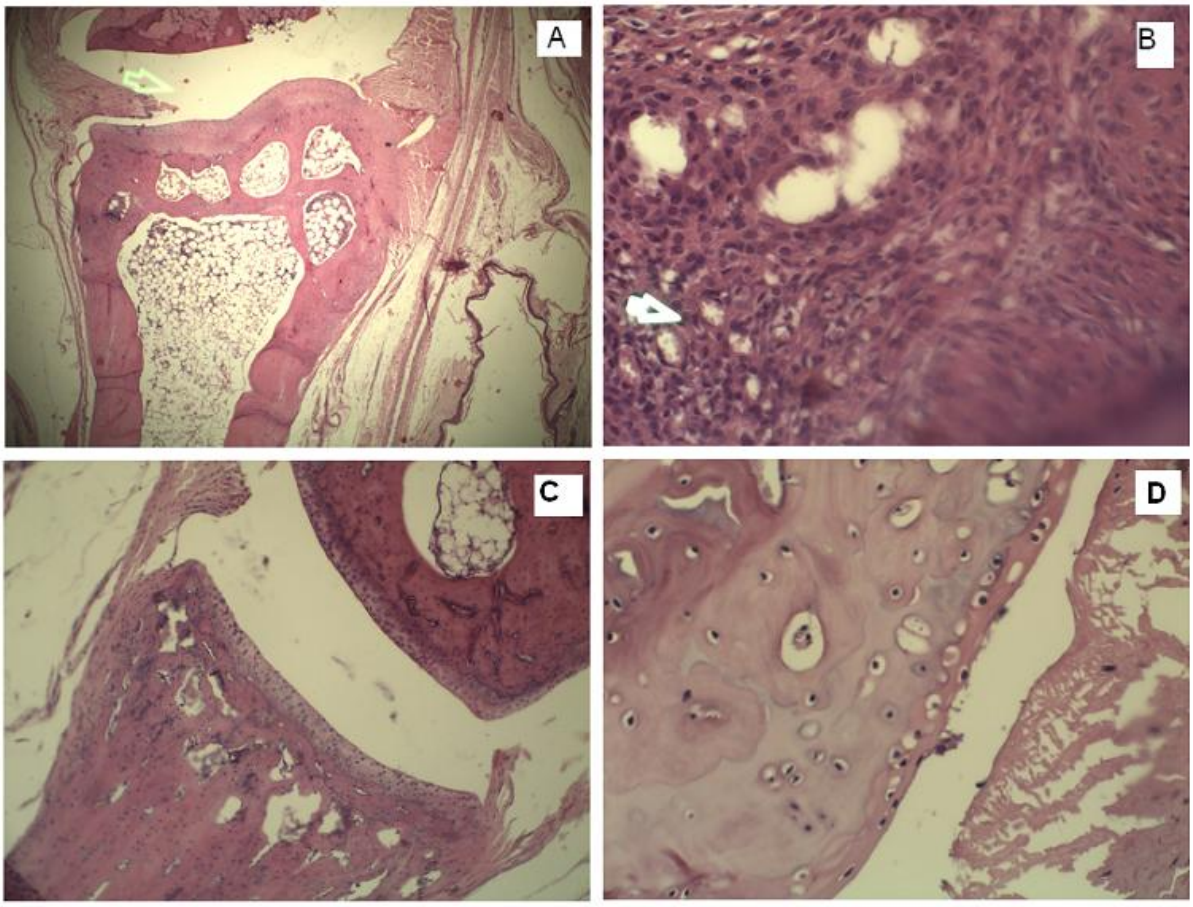


Figure 26: Coupes histologiques au niveau des articulations des rats; prolifération et infiltration des leucocytes observés dans le groupe arthritique. A) témoin négatif (non arthritique). B) témoin positif (arthritique). C) groupes curatifs. D) groupes préventifs.

2.3. Effets curatifs de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva*

2.3.1. Les signes cliniques

Le traitement curatif par l'extrait d'*Ajuga iva* (100 et 150 mg/kg) commençant14 jours après la 1ère immunisation réduit la sévérité du gonflement et de l'érythème par rapport au témoin positif à la fin de l'expérience. En effet, les groupes 5, 6 n'ont pas montré une différence par rapport au groupe témoin positif, au début de traitement, le score arthritique était : 6.2 ± 1.81, 6.25 ± 2.56 et 7.00 ± 2.57 pour les groupes 5, 6 et le témoin positif, respectivement. Néanmoins, dans le dernier jour du traitement, la progression de la maladie est nettement supprimée (Figure 27). La sévérité de l'arthrite au jour 40 était de 8.2 ± 4.2

dans le groupe témoin positif et de 4.22 ± 3.75 et 1.4 ± 1.4 dans les groupes curatifs traités avec les doses 100 et 150 mg/kg, respectivement.

Pour les groupes curatifs, le nombre des pattes arthritiques dans le 14ème jour après la 1ère immunisation était 3.7 ± 0.48 et 3.5 ± 0.75 pour les groupes 5 et 6 respectivement, chez le groupe témoin positif, le nombre des pattes arthritiques était 3.42 ± 0.81. Par contre à la fin de l'expérience (40 jours), le nombre des pattes arthritiques était 1.77 ± 1.58 et 1.2 ± 1.44 pour les groupes 5 et 6 respectivement, alors que chez le groupe témoin positif, le nombre des était 3.57 ± 0.61 (Figure 27).

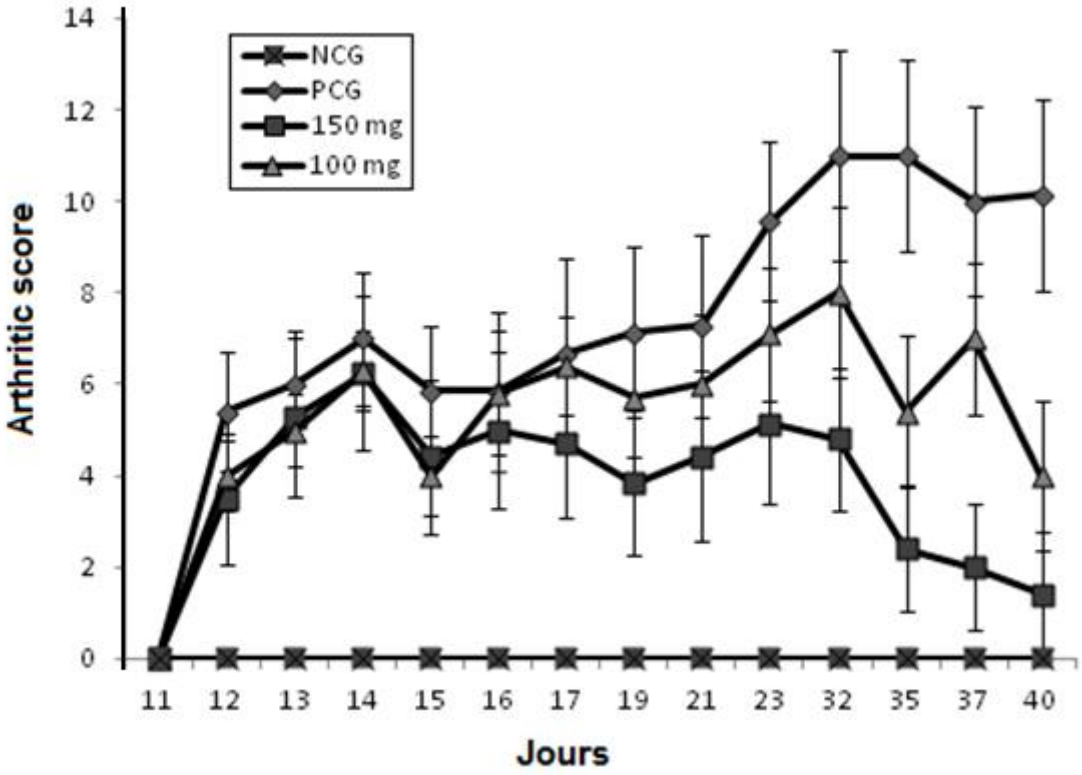


Figure 27: Le développement des signes cliniques (score arthritique) chez les rats (Albinos Wistar) des groupes curatifs traités par les doses 100 et 150 mg de l'extrait méthanolique d'*A. iva*/kg de poids corporel du rat (n =10). PCG: positive control group, NCG: negative control group.

2.3.2. Effet de l'extrait d'*Ajuga iva* sur le poids corporel

Le suivi régulier des animaux nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans la figure 28. Au début de l'expérience, les rats ont des poids homogènes. Distinctement, une différence significative du poids corporel est observée entre le groupe témoin positif et le groupe témoin négatif (P< 0.01). A la fin de l'étude de l'effet curatif, l'extrait d'*A. iva* a diminué la perte du poids corporel surtout dans le groupe traité avec la dose 150 mg/kg, par rapport au témoin négatif par contre la dose 100 mg/kg n'a pas ralenti la perte du poids.

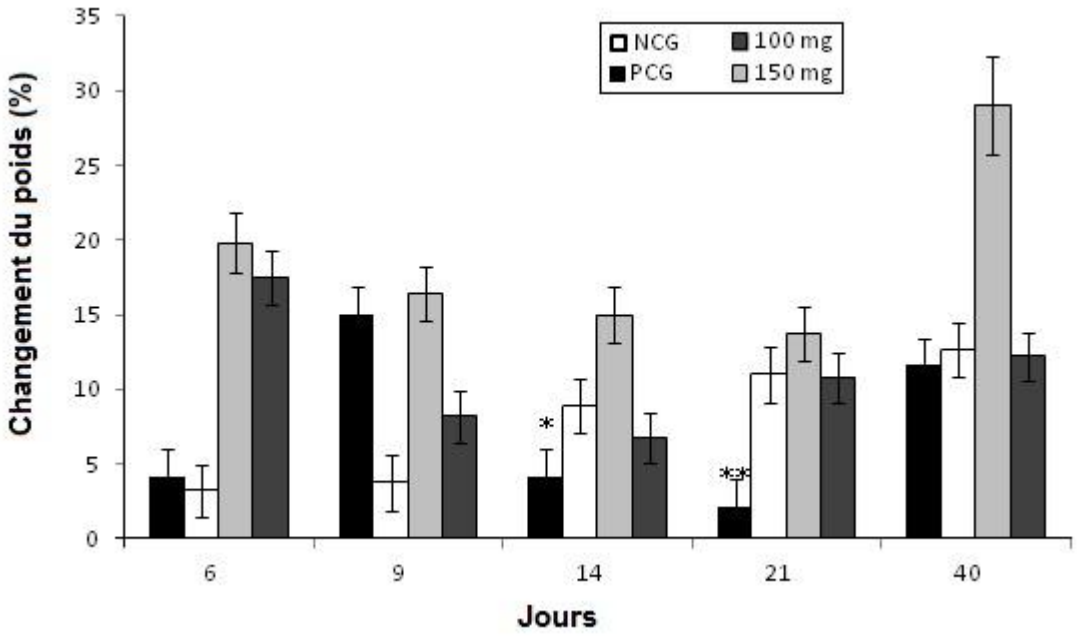


Figure 28 : Changement du poids corporel en fonction de temps chez les groupes curatifs traités par les doses 100 et 150 mg de l'extrait méthanolique d'*A. iva*/kg de poids corporel de rat. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. *P<0.05, ** P<0.01. PCG: positive control group, NCG: negative control group.

2.3.3. Effet d'*Ajuga iva* sur la vitesse de sédimentation

La vitesse de sédimentation est un examen simple qui explore indirectement le taux plasmatique de protéines de l'inflammation. La sédimentation des globules rouges est dépendante des caractéristiques morphologiques des hématies mais aussi des charges électrostatiques négatives qu'ils possèdent à leur surface. L'augmentation de certaines

protéines de l'inflammation, dont le fibrinogène, inhibe ces charges négatives, favorise l'agrégation des hématies entre elles et augmente leur vitesse de sédimentation.

Le traitement curatif par l'extrait méthanolique d'*A. iva* (EMAI) 100 et 150 mg/kg a remarquablement réduit la vitesse de sédimentation après 21 et 40 jours. Les valeurs de VS étaient 2.8 ± 0.96, 8 ± 2.8 et 8.9 ± 6.12 pour les groupes 5, 6 et le groupe témoin positif respectivement dans le 14ème jour (début du traitement). Après 21 jours de la première immunisation le traitement a diminué de manière significative ($p<0.001$) le taux de la vitesse de sédimentation ; la VS était 12 ± 5.3, 3.83 ± 3.7 et 19.3 ± 3.8 pour les groupes 5, 6 et le groupe témoin positif respectivement. A la fin du traitement curatif (40ème jour) le taux de la VS était 11.16 ± 3.83, 11.87 ± 5.125 et 4.66 ± 5.55 (Figure 29)

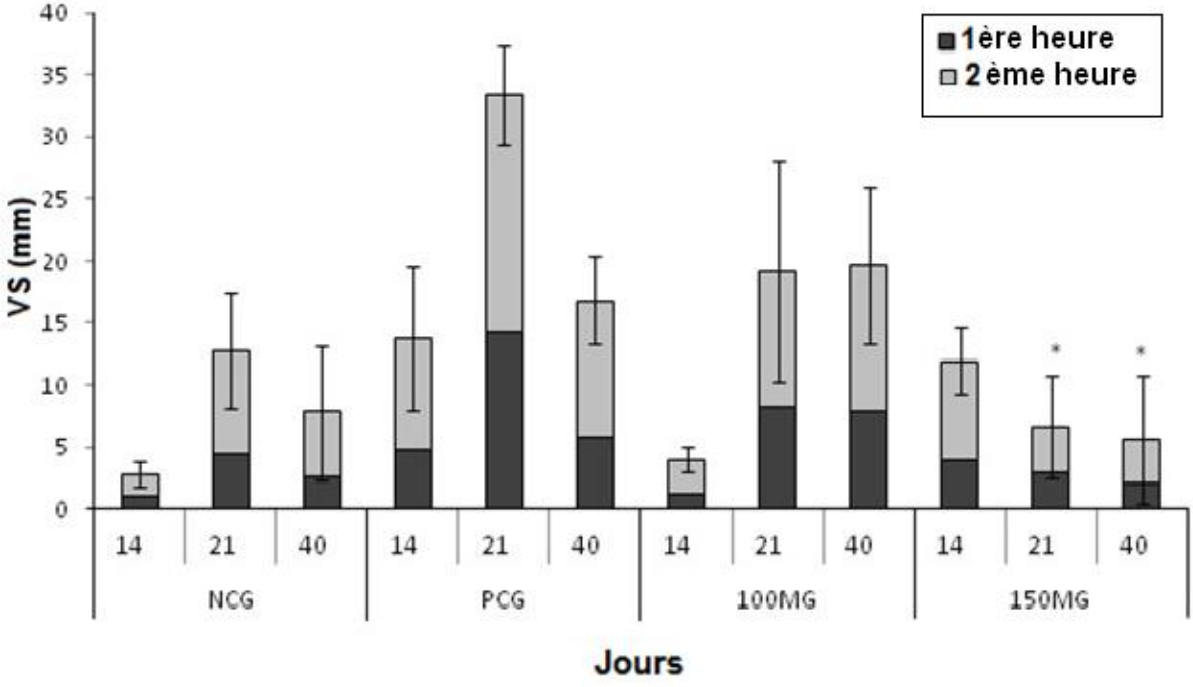


Figure 29 : la vitesse de sédimentation (VS), chez les groupes curatifs traités par les doses 100 et 150 mg de l'extrait méthanolique d'*A. iva*/kg de poids corporel de rat. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001. PCG: positive control group, NCG: négative control group.

2.3.4. Effet de l'extrait de *l'A. iva* sur la CRP

La CRP est une protéine de la réaction inflammatoire à cinétique rapide. Au cours d'un syndrome inflammatoire aigue, la CRP augmente plus précocement que la VS. Après 14, 21et 40 jours de la 1ère immunisation, des échantillons du sang étaient pris dans des tubes secs pour les groupes curatif, la protéine C a été détecté par des anticorps anti protéine C. L'extrait d'*A. iva* 100 et 150 mg/kg a remarquablement réduit de manière significative (P< 0.01) le taux de la protéine C dans le sérum après 21 jours de traitement curatif (Figure 30).

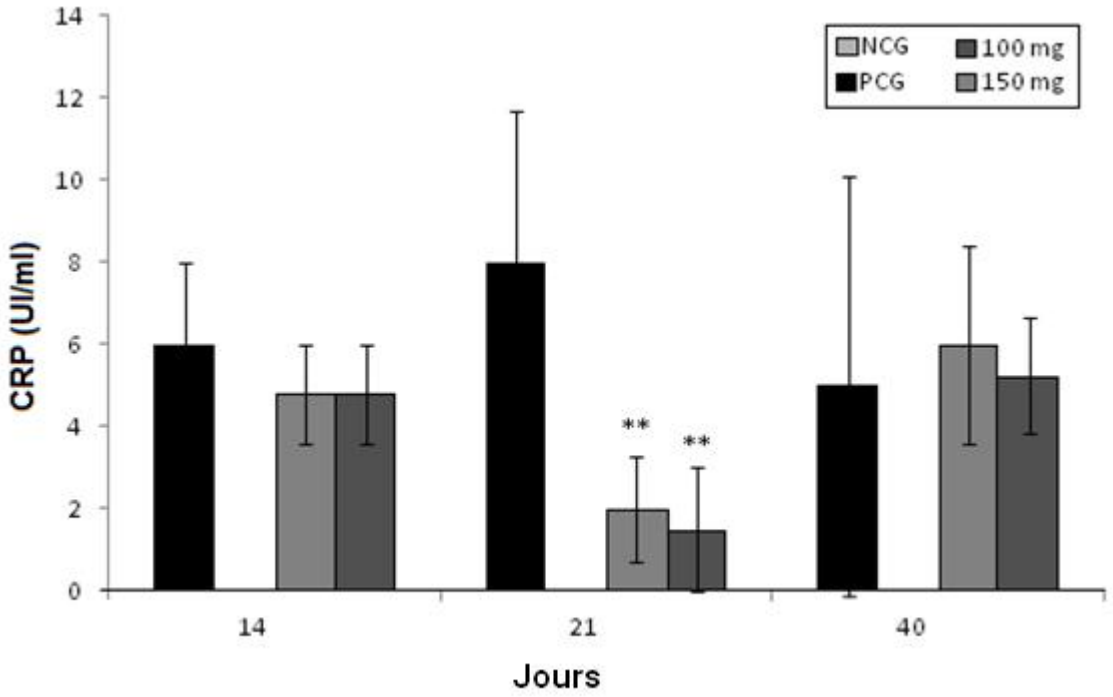


Figure 30 : Le taux de la protéine C dans le sérum des rats chez les groupes curatifs traités par les doses 100 et 150 mg de l'extrait méthanolique d'*A. iva*/kg de poids corporel de rat. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. *: P<0.05, **: P<0.01. PCG: positive control group, NCG: negative control group.

2.3.5. Effet de l'EMAI sur le dénombrement des globules blancs

Le nombre des leucocytes est un paramètre très important pour l'évaluation de la sévérité l'arthrite. Après 14, 21et 40 jours des échantillons du sang ont été prélevés dans des tubes renfermant de l'EDTA et le nombre des leucocytes est évalué par un automate. Une

diminution des nombres des leucocytes a été remarquée chez les rats traités (curatif), par rapport au lot témoin positif dans le 21^{éme} et 40^{éme} jour (Figure. 31). Le nombre des leucocytes dans le 21ème jour était 7.77 ± 1.55 et 7.79 ± 4.76 pour les groupes 5 et 6 respectivement, par contre chez le groupe témoin positif, le nombre des leucocytes était 9.47 ± 1.82. Par contre à la fin de l'expérience (40 jours), le nombre des leucocytes était 9.29 ± 1.58 et 8.41± 0.96 pour les groupes 5 et 6 respectivement, par contre chez le groupe témoin positif, le nombre des leucocytes était 10.56 ± 1.48 (figure. 31).

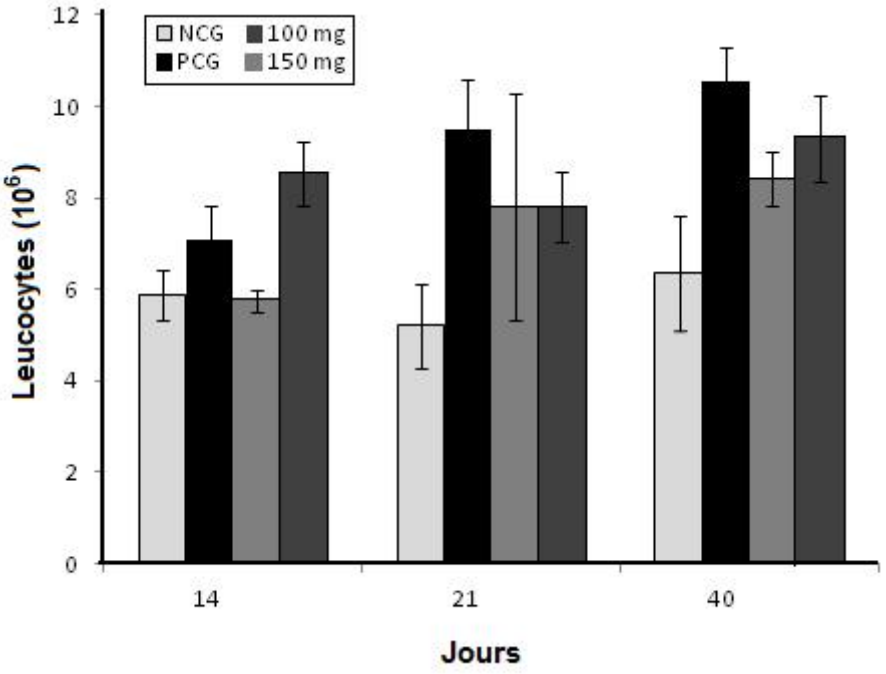


Figure 31 : Le nombre des leucocytes dans le sang des rats chez les groupes curatifs traiter par les doses 100 et 150 mg de l'extrait méthanolique de *l'A. iva*/kg de poids corporel de rat. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10.

2.3.6. Effet d'*A. iva* sur les changements histologiques

A la fin de l'expérience, les pattes ont été prélevées, fixées dans le formol, puis colorées avec le réactif hématoxyline éosine, des coupes histologiques sont effectués et la lecture est effectuée par Dr Kheddara. Nous avons observé des infiltrations des lymphocytes et des PNN au niveau des articulations des rats arthritiques avec l'érosion de l'os et la destruction du cartilage, en comparaison avec le groupe témoin négatif (Figure 26).

Le traitement curatif par l'extrait d'*Ajuga iva* a montré des effets bénéfiques sur ces dernières manifestations pathologiques où on a observé un minimal ou aucune évidence de l'inflammation. Des degrés semblables de destruction des articulations et la sévérité de l'arthrite ont été observés dans le métatarse, tarse, cheville et phalanges (revenir à la Figure 26 C).

3. ETUDE DE L'EFFET TOXIQUE DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE D'*A. IVA* CHEZ LES RONGEURS

3.1. Toxicité aigue

La toxicité aigue est évaluée par l'administration des doses unique très importantes qui peuvent provoquer la mortalité ou des signes de toxicité chez des animaux de laboratoire, au cours des études de toxicité aigue il n'y avait aucune mortalité ou aucun signe de toxicité observés après l'administration par voie orale de l'extrait d'*Ajuga iva* à n'importe quelle dose jusqu'à la dose la plus élevée (14 g/kg), qui était la dose sans aucun effet défavorable observé (No Observed Adverse Effect Level : NOAEL), (Alexeeff *et al.*, 2002). Cependant, le taux de mortalité après l'administration de l'extrait méthanolique par voie intra-péritonéale est dose dépendante (Tableau 2). Le taux de mortalité de 0% à une dose de 2 g/kg a graduellement atteint 80% à 6 g/kg. La NOAEL pour la dose intra-péritonéale était 2 g/kg, alors que la dose la plus basse qui a provoqué des effets toxiques (Low Observed Adverse Effect Level : LOAEL) était 3 g/kg. Quelques effets nuisibles, tels que l'hypoactivité et les diarrhées, ont été observés juste après l'injection intra-péritonéale de l'extrait, alors que d'autres (exemple anorexie et perte du poids) étaient observés plus tard, étaient plus prononcés aux doses les plus élevées et ont persisté jusqu'à la mort des animaux. La dose létale de 50 % des rats par voie intra-péritonéale (LD50), de l'extrait d'*A. iva* chez les souris calculée par la méthode de Miller et Tainter (1944) était 3980 mg/kg (Figure 32).

Tableau 2 : Toxicité aiguë de l'extrait méthanolique *d'Ajuga iva* administré par injection intra péritonéale aux souris Albinos.

Doses (g/kg)	Log dose	mortalité/traité	% de mortalité	probité	Symptômes de toxicité
0	-	0/10	0	∞	RAS
2	0.30	0/10	0	-∞	Hypoactivité avec douleurs abdominale
3	0.477	2/10	20	4.16	Hypoactivité avec douleurs abdominale
4	0.620	4/10	40	4.75	Hypoactivité, état d'épuisement total avec anorexie
5	0.699	7/10	70	5.52	Hypoactivité, état d'épuisement total avec anorexie
6	0.778	8/10	80	5.88	Hypoactivité, état d'épuisement total avec anorexie

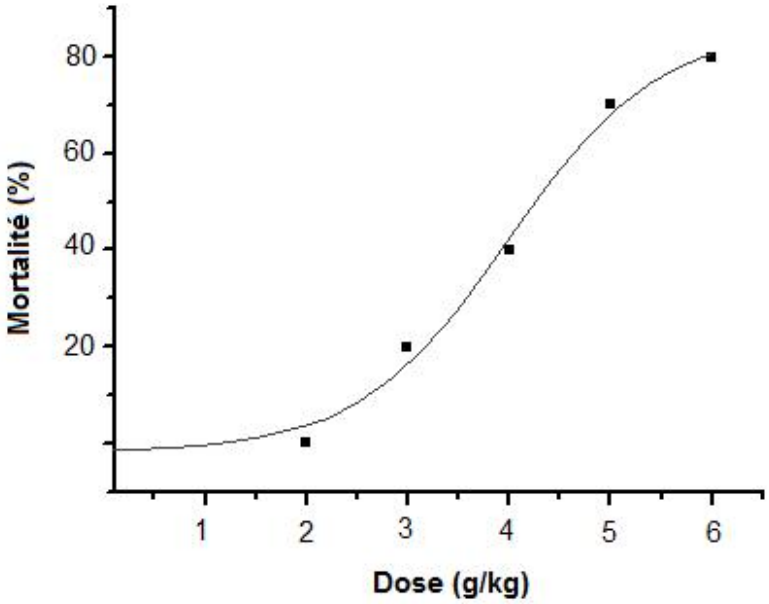


Figure 32 : Courbe Dose-mortalité de l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva* administre par voie intra péritonéale chez des souris Albinos. DL_{50} = 3,980g/kg.

La valeur absolue de la DL_{50} indique qu'il s'agit d'un produit de faible toxicité (Hodge et Sterner, 1943), (Tableau 3).

Tableau 3 : Classe de toxicité selon l'échelle de toxicité de Hodge et Sterner (1943).

Classe de toxicité	DL50 (mg/kg, rat, souris)
Extrêmement toxique	< 1
Très toxique	1 à 50
Moyennement toxique	50 à 500
Faiblement toxique	500 à 5000
Pratiquement non toxique	5000 à 15000
Relativement sans danger	> 15000

3.2. Études de la toxicité chronique chez les rats

3.2.1. Effet sur le poids corporel et la mortalité

L'administration orale de différentes doses de l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva* aux rats pendant 3 mois, à raison d'une dose par jour n'a montré aucune différence significative, dans le gain du poids corporel entre le témoin et les groupes traités pendant toute la durée de l'expérience. Aucune létalité n'a été enregistrée pour toutes les doses jusqu'au maximum de 600 mg/kg (NOAEL) pendant les 90 jours du traitement (Figure 33).

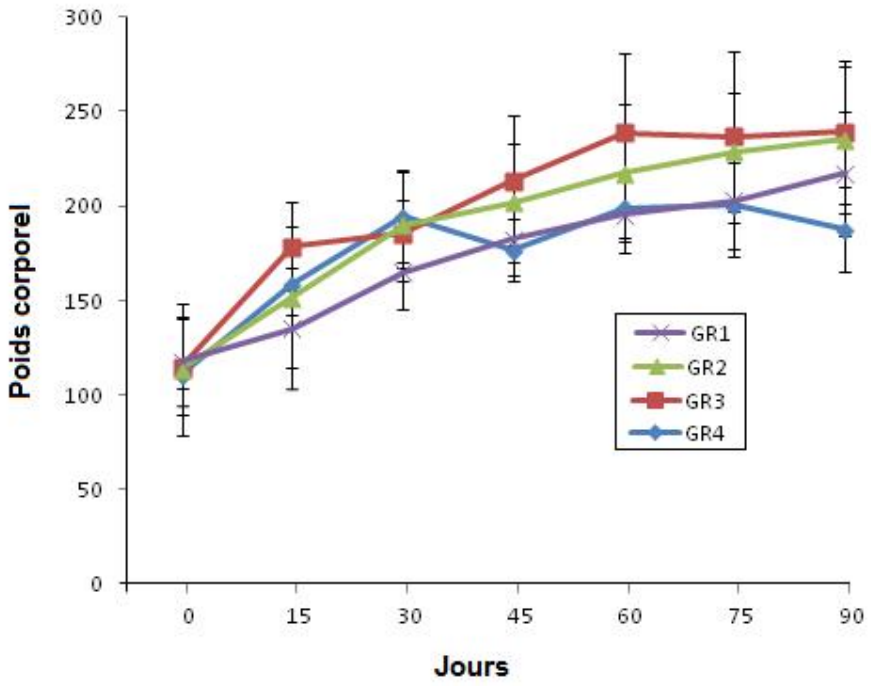


Figure 33 : Changements du poids corporel des rats après l'administration chronique de l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva* par voie orale. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. GR1 groupe traité avec la dose 600 mg/kg, GR2 groupe traité avec la dose 300 mg/kg, GR3 groupe traité avec la dose 100 mg/kg, GR4 groupe témoin (non traité).

3.2.2. Effet de l'administration chronique de l'extrait d'*A. iva* sur les paramètres hématologiques des rats.

L'effet de l'administration chronique par voie orale de l'extrait d'*Ajuga iva* sur les paramètres hématologiques est présenté dans le tableau 5. Une augmentation des nombres de plaquettes et de l'hémoglobine a été observée dans les groupes traités, le 60ème et 90ème jour du traitement par rapport aux témoins ($p < 0.05$). Cette augmentation est observée jusqu'à la fin du traitement (90ème jours). Tous les autres paramètres (hématocrite, GB et GR) ont demeuré dans les limites normales le long de la période du traitement.

Tableau 5 : Valeurs des paramètres hématologiques après 30, 60 et 90 jours de l'administration chronique de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* par voie orale chez les rats.

	Jours	**GB×10^9L**	**plaq×10^9L**	**GR×10^{12}L**	**HT%**	**HB g/L**
GR1	30	7.86 ± 1.83	524 ± 113.4	8.57 ± 1.05	44.3 ± 5.59	14.27 ± 1.37
	60	9.85 ± 3.26	906.7 ± 58.7	9.93 ± 1.05	50.46 ± 3.09	15.79 ± 1.09
	90	9.42 ± 1.77	898.7± 27.3	9.65 ± 1.34	49.63 ± 2.16	16.89 ± 2.13
GR2	30	9.08 ± 1.3	562.2 ± 93.4	8.31 ± 0.41	44.34 ± 3.29	14.14 ± 1.19
	60	9.52 ± 3.5	871.7 ± 173	10.7 ± 0.51	54.14 ± 2.95	16.8 ± 0.98
	90	8.20 ± 2.4	804.3 ± 166	9.67 ± 1.53	48.73 ± 5.35	16.15 ± 1.45
GR3	30	6.06 ± 3.01	390.0 ± 144	7.77 ± 1.05	42.28 ± 5.37	14.13 ± 1.76
	60	6.14 ± 1.8	776.6 ± 202	9.97 ± 1.12	52.93 ± 3.85	16.24 ± 1.27
	90	9.27 ± 2.47	704 ± 150	9.86 ± 0.78	50.65 ± 2.58	16.68 ± 0.55
GR4	30	8.85 ± 2.79	481.2 ± 141	7.74 ± 0.51	43.75 ± 2.90	14.86 ± 0.91
	60	8.69 ± 2.76	456.3 ± 94.2	7.67 ± 0.38	43.01 ± 2.17	14.68 ± 0.17
	90	6.83 ± 4.04	752 ± 208.6	8.32 ± 0.92	44.57 ± 2.22	14.4 ± 0.6

3.2.2.1. Effet de traitement sur le nombre des globules blancs

Les globules blancs, ou leucocytes, forment une famille de cellules constituée de polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles, basophiles), de lymphocytes et de monocytes et chaque type joue un rôle bien spécifique. Les globules blancs interviennent dans les mécanismes de l'inflammation, de l'immunité et donc dans la défense de l'organisme contre les agressions. Une augmentation du nombre de globules blancs peut survenir en cas d'infection bactérienne, de leucémie, d'allergie ou de parasitose.

Au cours de notre étude d'administration de l'extrait d'*A. iva* chez les rats pendant 90 jours aucun changement n'a été observé sur le nombre des globules blancs, entre le groupe

traité et le groupe témoin, 7.86 ± 1.83×10^9/ L pour le groupe traité avec la dose 600 mg/kg, et le groupe témoin 8.85 ± 2.79 ×10^9 /L. En comparant le nombre des globules blancs chez les groupes traités avec les doses 600 mg/kg dans les 30 jours par rapport à 60 et 90 jours ; nous avons observé une augmentation des globules blancs. Ces valeurs passent de 7.86 ± 1.83 dans 30 jours à 9.85 ± 3.26 dans 60 jours puis baissent à la valeur précédente; par contre les valeurs des globules blancs restent inchangées dans le groupe témoin (Tableau 5).

3.2.2.2. Effet de traitement sur le nombre des plaquettes

Les plaquettes interviennent dans les premiers instants qui suivent l'effraction d'un vaisseau et le saignement. Elles s'agglutinent entre elles et vont boucher la brèche vasculaire. Au passage, elles libèrent de nombreuses substances essentielles à la poursuite des phénomènes de coagulation. Une augmentation marquante de leur nombre est dénommée «thrombocytose». Cela peut être consécutif à un syndrome inflammatoire, une atteinte à la moelle osseuse, une infection…

Au cours de la présente étude, nous avons observé une augmentation significative ($p< 0.05$) du taux des plaquettes par apport au témoin, après 60 et 90 jours du traitement. Ces valeurs sont : 906.7± 58.73×10^9/L et 898.7±27.3 ×10^9/L pour le groupe traité avec la dose 600 mg/kg. Cette augmentation est importante par apport au groupe témoin où on observe une faible augmentation du nombre des plaquettes 456.3 ± 94.2 et 752 ± 208.66, à 60 et 90 jours respectivement**.**

Une augmentation du taux des plaquettes est observée dans les 60 et 90 jours par rapport à 30 jours pour les groupes traités par rapport au témoin qui reste inchangé. Pour le groupe traité avec la dose 600 mg /kg, ces valeurs passent de 524 ± 113.42 dans les 30 jours à 906.7± 58.73 et 898.7 ± 27.3 à 60 et 90 jours respectivement.

3.2.2.3. Effet du traitement sur le nombre des globules rouges

Les globules rouges sont chargés d'apporter l'indispensable oxygène dans les tissus. Une augmentation s'observe lors de certaines maladies du sang, l'insuffisance cardiaque. Une baisse des globules rouges peut être liée à une hémorragie, à une hémolyse (destruction des globules rouges), à des affections du sang (type leucémie) ou à un syndrome inflammatoire. L'extrait d'*A. iva* n'a pas causé de différence significative entre le nombre des globules rouges chez les groupes traités. La comparaison du nombre des globules rouges entre 30, 60

et 90 jours, montre une légère augmentation du nombre des globules rouges mais cette augmentation reste non significative.

3.2.2.4. Effet de traitement sur l'hémoglobine

L'hémoglobine est le pigment rouge vif qui donne la couleur au sang artériel et qui est contenu dans les globules rouges. Elle est destinée à véhiculer l'oxygène des poumons vers les tissus et, en retour, le gaz carbonique des tissus vers les poumons. Le taux d'hémoglobine s'accroît en cas de déshydratation et lors de certaines maladies du sang. Une baisse significative permet de parler d'anémie. Elle peut aussi être liée à une hémorragie, à certaines affections de type cancer ainsi qu'à des syndromes inflammatoires.

Au cours de notre étude consacré à vérifier l'effet toxique de l'extrait méthanolique sur les paramètres hématologiques, nous n'avons pas observé des changements significatifs sur le taux d'hémoglobine entre les groupes traités et le groupe témoin dans les 30 jours du traitement, mais après 60 et 90 jours nous avons observé des changements significatifs ($P < 0.01$) entre le groupe témoin et les groupes traités. La comparaison du taux d'hémoglobine entre 30, 60 et 90 jours permet de remarquer une augmentation du taux d'hémoglobine à 60 et 90 jours.

3.2.2.5. Effet de traitement sur l'hématocrite

L'ématocrite est le rapport entre le volume occupé par les globules rouges et celui du sang total. Ces examens apportent des informations fondamentales, en particulier lorsque l'on suspecte une anémie (baisse des globules rouges) ou une infection. Au cours de notre étude nous n'avons pas observé de changements entre les lots traités et le groupe témoin. La comparaison du taux d'hématocrite entre les 30, 60, et 90 jours a montré une augmentation du taux d'hématocrite dans les lots traités mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative. Ces valeurs passent de 44.29 ± 5.59, 50.46 ± 3.09 et 49.63±2.16 pour le groupe traite avec la dose 600 mg /kg dans les 30, 60, et 90 jours du traitement, respectivement.

3.2.3. Effet de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* sur les paramètres biochimiques

L'effet de l'administration chronique par voie orale de l'extrait d'*A. iva* sur les paramètres biochimiques est présenté dans le tableau 6. Une diminution du taux de glucose, de triglycéride et de cholestérol ont été observés dans les groupes traités le 60ème et 90ème jour

du traitement par rapport aux témoins, une augmentation du taux de GOT et GPT dans les lots traités par rapport au témoin, cette augmentation est observée jusqu'à la fin du traitement (90ème jours). Tous les autres paramètres (urée et créatinine) ont demeuré dans les limites normales le long de la période du traitement.

3.2.3.1. Effet sur le taux de Glucose sérique

L'administration de l'extrait méthanolique de *l'A. iva* pendant 13 semaines a provoqué une diminution significative (P<0.001) et dose dépendante du taux du glucose sérique chez les rats traités par comparaison aux rats témoins dans les 60 jours de traitement. La diminution persiste jusqu'à la fin du traitement (90 jours) (Figure 34).

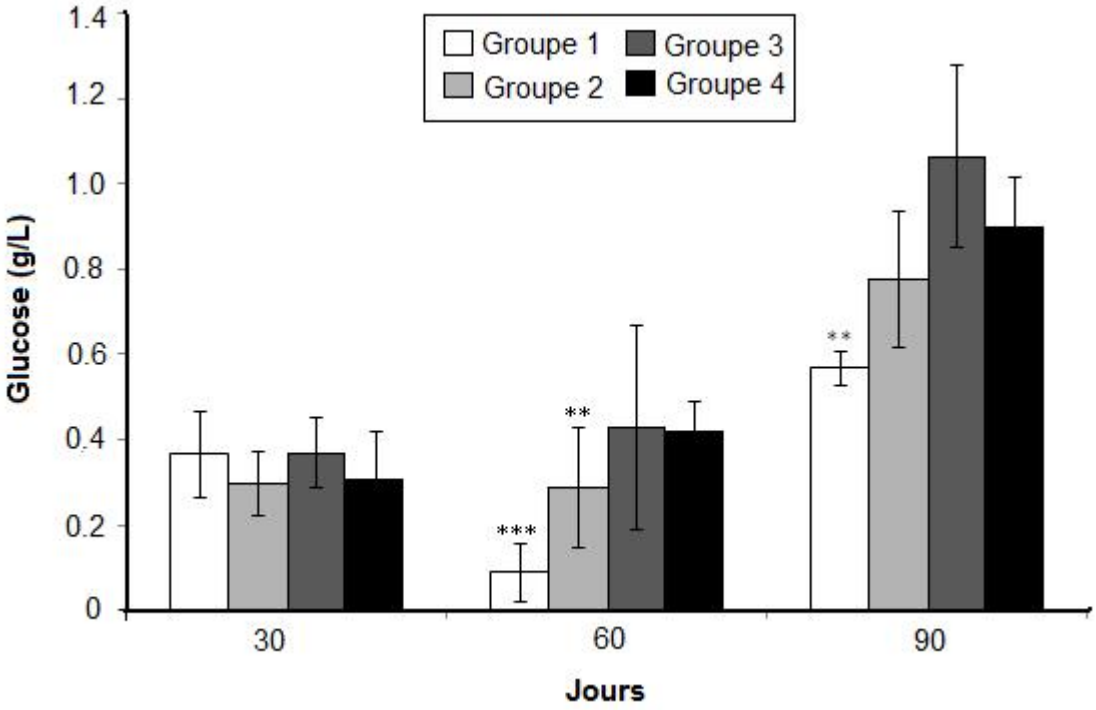


Figure 34: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de glucose après 4, 8 et 13 semaines de traitement. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. GR1 groupe traité avec la dose 600 mg/kg, GR2 groupe traité avec la dose 300mg/kg, GR3 groupe traité avec la dose 100mg/kg, GR4 groupe témoin (non traité). *P<0.05, ** P<0.01.

3.2.3.2. Effet sur le taux d'urée sérique

Après les 4 premières semaines de traitement, l'EMAI n'a pas provoqué un changement du taux d'urée des rats du lot recevant les doses 600, 300 et 100 mg/kg par comparaison aux rats témoins. La comparaison des taux d'urée de la 4ème semaine à ceux de la 8ème et 13ème semaine de traitement montre dans le lot de rats témoins une augmentation de 0.17 mg/ml à la 13ème semaine. Tandis que dans les lots traités, les taux d'urée de la 8ème semaine baissent mais de façon non significative par comparaison à ceux de la 4ème semaine puis il y a une augmentation dans la 13ème semaine (Figure 35).

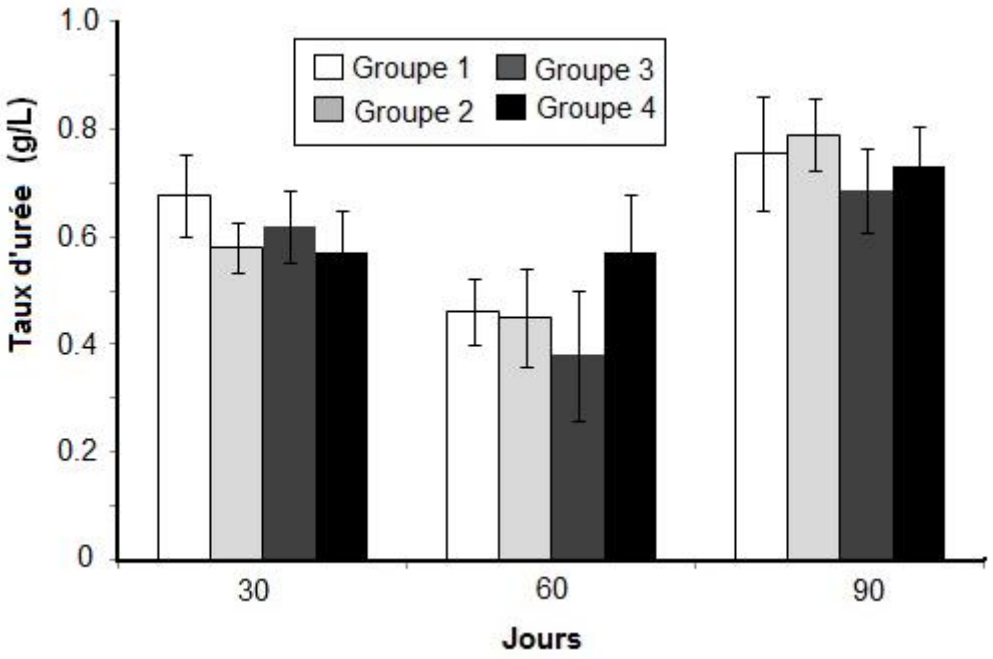


Figure 35: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de l'Urée. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. GR1 groupe traité avec la dose 600 mg/kg, GR2 groupe traité avec la dose 300mg/kg, GR3 groupe traité avec la dose 100mg/kg, GR4 groupe témoin (non traité). *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

3.2.3.3. Effet sur le taux de Créatinine sérique

La comparaison des taux de la 4ème, 8éme et 13ème semaines par rapport à ceux du lot témoin montre que l'extrait n'a pas induit de modification significative sur le taux de créatinine sérique (P>0.05). Cependant, la comparaison des taux de créatinine de la 4ème semaine à ceux de la 8ème et 13éme semaine de groupe 1 (600 mg/Kg) montre une diminution des taux de créatinine de 12.32 ± 2.2 à la 4ème semaine à 7.18 ± 0.28, 6.92 ± 0.51 mg/ml à la 8ème et 13éme semaine, soit une différence de 5.04 et 5.4 mg/mL, respectivement. Une diminution est également observé chez les rats du lot témoin, où le taux de créatinine passe de11.92± 2.2 mg /ml à la 4ème semaine à 7.67±0.28 mg 8.15 ± 1.2 mg/mL à la 8ème et 13éme semaines soit une différence de 4.25 et 3.77mg/mL, respectivement (Figure 36).

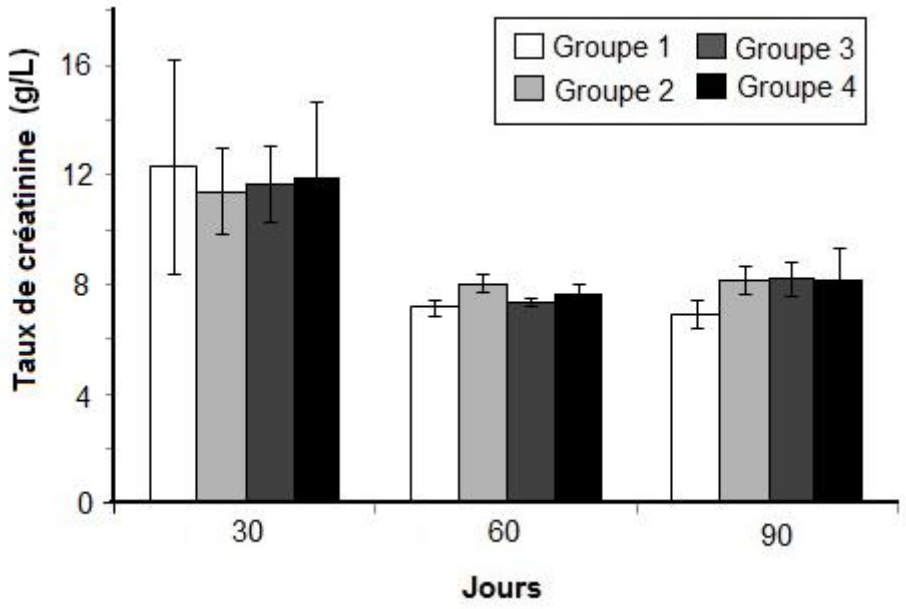


Figure 36: Effet de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* sur le taux de Créatinine. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. GR1 groupe traité avec la dose 600 mg/kg, GR2 groupe traité avec la dose 300 mg/kg, GR3 groupe traité avec la dose 100 mg/kg, GR4 groupe témoin.

3.2.3.4. Effet sur le taux de cholestérol sérique

L'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* a provoqué une variation du taux de cholestérol sérique en fonction des doses. Après les 4 premières semaines de traitement, l'extrait de

l'Ajuga iva n'a pas provoqué un changement du taux de cholestérol des rats du lot recevant les doses 600, 300 et 100 mg /kg par comparaison aux rats témoins. Par contre Après les 8 premières semaines de traitement, l'extrait de l'*Ajuga iva* a provoqué une diminution (P<0.05) du taux de cholestérol des rats traités par comparaison aux rats témoins.

La comparaison des taux de cholestérol à la 4ème semaine à ceux des 8ème et 13ème semaines du traitement montre chez le lot des rats témoins une augmentation à la 13ème semaine. Tandis que dans les lots traités, les taux de cholestérol de la 8ème semaine baissent de façon significative (P<0.05) par comparaison à ceux de la 4ème semaine puis il y a une augmentation dans la 13ème semaine (Figure. 37).

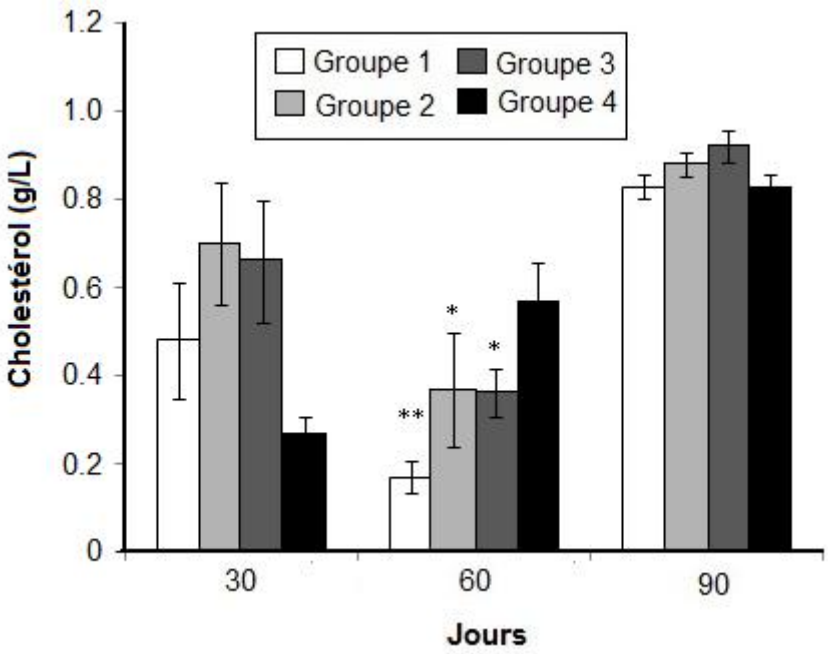


Figure 37: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux du cholestérol. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. GR1 groupe traité avec la dose 600 mg/kg, GR2 groupe traité avec la dose 300 mg/kg, GR3 groupe traité avec la dose 100 mg/kg, GR4 groupe témoin (non traité). *P<0.05, ** P<0.01.

3.2.3.5. Effet sur le taux des triglycérides sériques

Après les 8éme et 13éme semaines de traitement, l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* a provoqué une diminution significative (P<0.001) du taux de TG des rats qui ont été traités

surtout avec la dose de 600 mg /kg par comparaison aux rats témoins. La comparaison des taux de TG de la 4ème semaine à ceux de 8ème et 13ème semaines de traitement montre dans le lot de rats témoins une augmentation puis une diminution à la 13ème semaine. Tandis que dans les lots traités, le taux de TG de la 8ème et 13ème semaine baissent de façon significative (P<0.01) par comparaison à ceux de la 4ème semaine cette diminution parait dose dépendante (Figure 38).

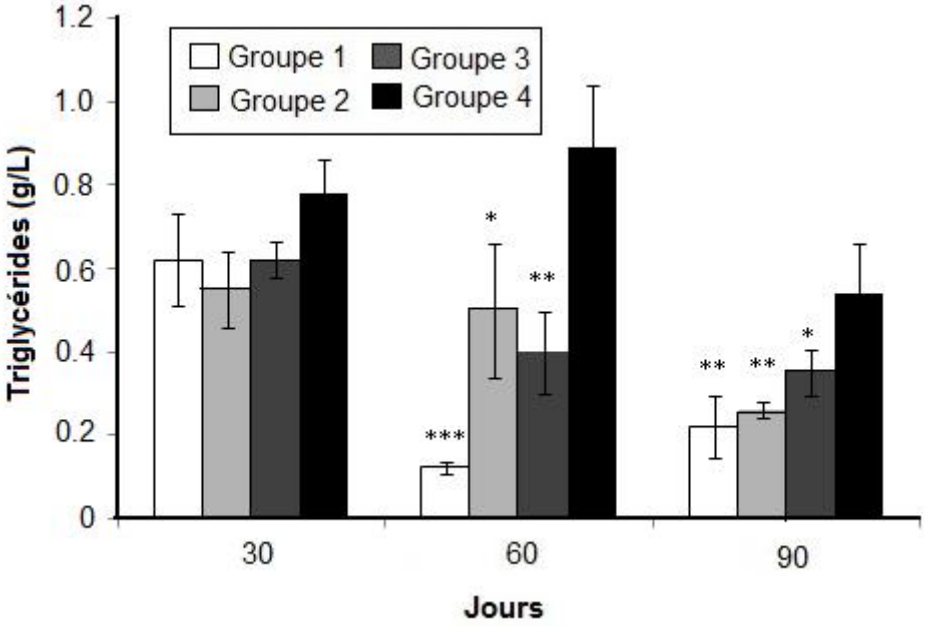


Figure 38: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de Triglycéride. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. GR1 groupe traité avec la dose 600 mg/kg, GR2 groupe traité avec la dose 300 mg/kg, GR3 groupe traité avec la dose 100mg/kg, GR4 groupe témoin (non traité). *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

3.2.3.6. Effet sur le Taux d'ASAT

L'administration en traitement subaigu de 13 semaines de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* a provoqué une augmentation significative (P<0.05) du taux d'ASAT (GOT) sérique seulement dans les lots des rats ayant reçu les doses 300 et 600 mg/kg par comparaison aux rats du lot témoin a la fin de l'expérience mais cette augmentation n'est pas dose dépendante. La comparaison des taux d'ASAT de la 13ème semaine à ceux de la 4ème et 8ème semaine a révélé une augmentation significative (P<0.05) du taux d'ASAT des lots

traites avec des doses 300 et 600 mg/kg, mais aucun changement n'a été observé chez le lot témoin (Figure 39).

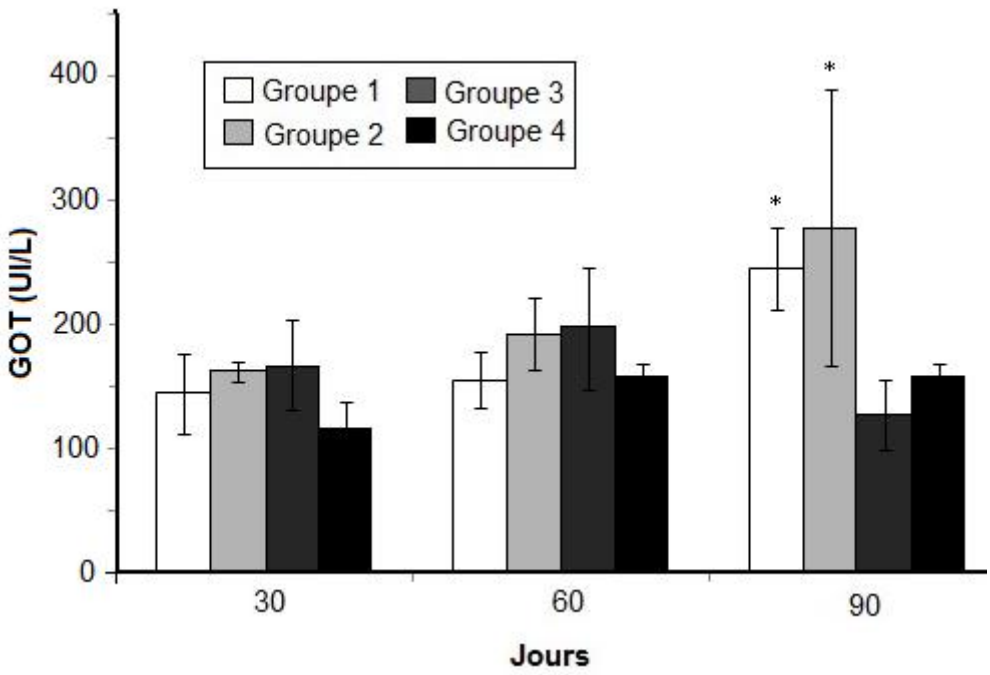


Figure 39: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de GOT. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. GR1 groupe traité avec la dose 600 mg/kg, GR2 groupe traité avec la dose 300mg/kg, GR3 groupe traité avec la dose 100mg/kg, GR4 groupe témoin (non traité). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001:

3.2.3.7. Effet sur le taux d'ALAT

L'administration de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* a provoqué des variations significatives (P<0.001) du taux d'ALAT (GPT) sérique chez les rats traités. Cette augmentation est dose dépendante. Les taux à la 4ème semaine ont montré une différence très significative (P<0.001) par comparaison au taux obtenu dans le lot témoin. Les mêmes résultats ont été obtenus dans la 8ème semaine, tandis qu'à la 13ème semaine, on a enregistré dans les lots de rats traités une augmentation significative (P<0.01) par rapport au témoin.

En ce qui concerne la comparaison des taux d'ALAT sérique de la 13ème semaine à ceux de la 4ème et 8ème semaine, les rats des lots traités ont montré une diminution significative (P<0.01) de ce taux à la 8ème semaine. Ce dernier passe de 104.5±12.1, 118.5±14.65 UI/L à la 4ème et 8ème semaine à 85.83±23 UI/L à la 13è semaine ; Soit une diminution de 32.67 U/L (Figure 40).

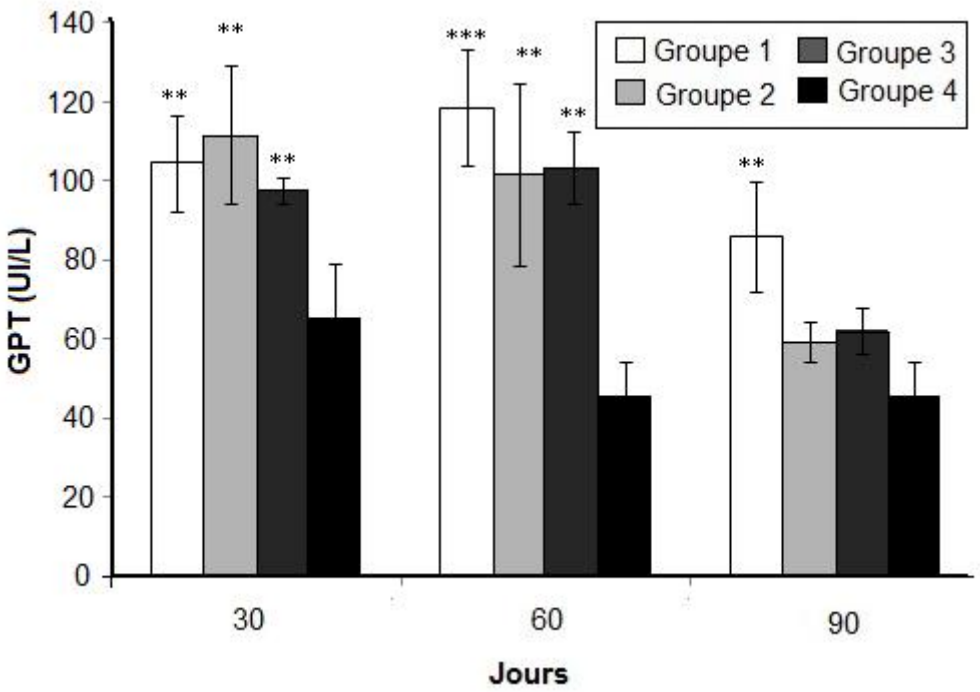


Figure 40: Effet de l'extrait méthanolique de *l'Ajuga iva* sur le taux de GPT. Après 4, 8 et 13 semaines de traitement. Les barres représentent les moyennes ± écart-type; n=10. GR1 groupe traité avec la dose 600 mg/kg, GR2 groupe traité avec la dose 300 mg/kg, GR3 groupe traité avec la dose 100 mg/kg, GR4 groupe témoin. *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

3.2.4. Effet sur le poids des organes

Après 90 des jours les rats sont sacrifiés et les organes essentiels sont prélevés, pesés et macroscopiquement examinés les résultats sont motionnés dans le tableau 7. Les coupes histologiques sont présentées dans la figure 41.

Tableau 7 : montre les effets de différentes doses de l'extrait méthanolique *d'Ajuga iva* sur le poids du foie et du rein chez les rats.

organe	Témoin (0 mg/kg)	G1 100 mg/kg	G2 300 mg/kg	G3 600 mg/kg
Foie	6.32± 0.46	7.86± 0.45	6.83 ± 0.32	7.52 ± 0.22
Rein	0.65 ± 0.024	0.73± 0.072	0.67 ± 0.059	0.67 ± 0.017

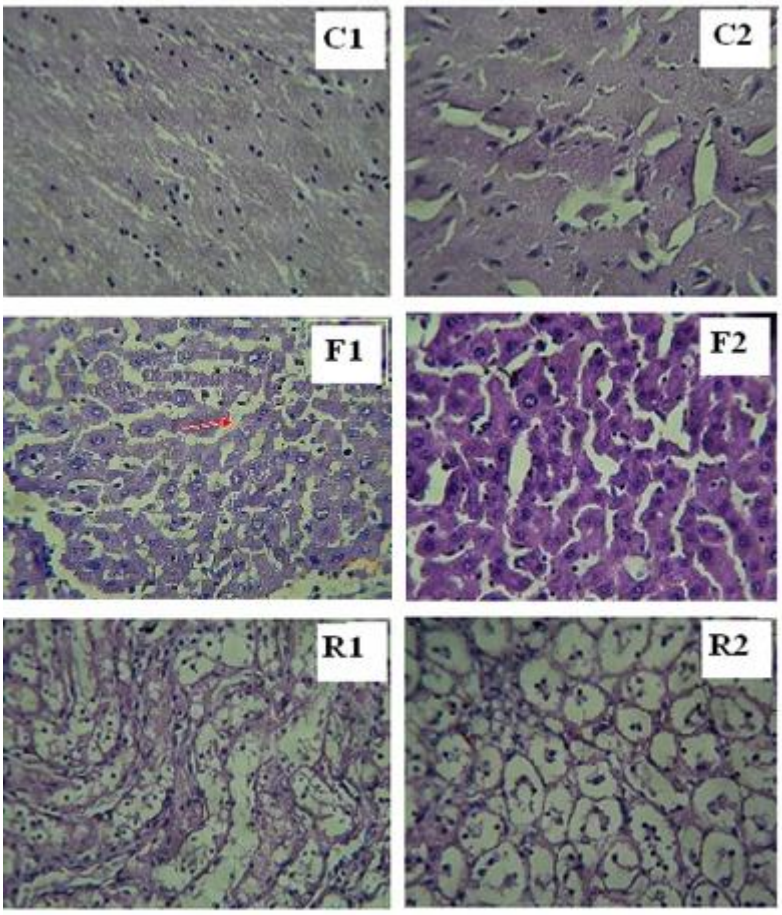


Figure 41: Coupes histologiques au niveau de différents organes : foie montrant des dispositifs normaux dans les rats témoins (F2), et le foie des rats qui ont été traité oralement avec 600 mg/kg de l'extrait d'Ai (90 jours) montrant une congestion sinusoïdale centro-lobulaire marquée (F1), rein montrant des dispositifs normaux dans des rats témoins (R2) et des rats qui ont été traités (R1), cerveau montrant les dispositifs normaux dans les rats témoins (C2) et le cerveau des rats traités (C1).

3.3. Effet sur la reproduction

Après la mise-bas, les nouveaux nées sont pesés et macroscopiquement observés, aucune différence significative n'a été observe entre les deux lots traité et témoins. En ce qui concerne le poids des nouveaux née, le poids était 6 et 6.125 g respectivement. Pour les coupes histologiques des testicules aucun changement n'a été observe entre les deux lots (figure 42).

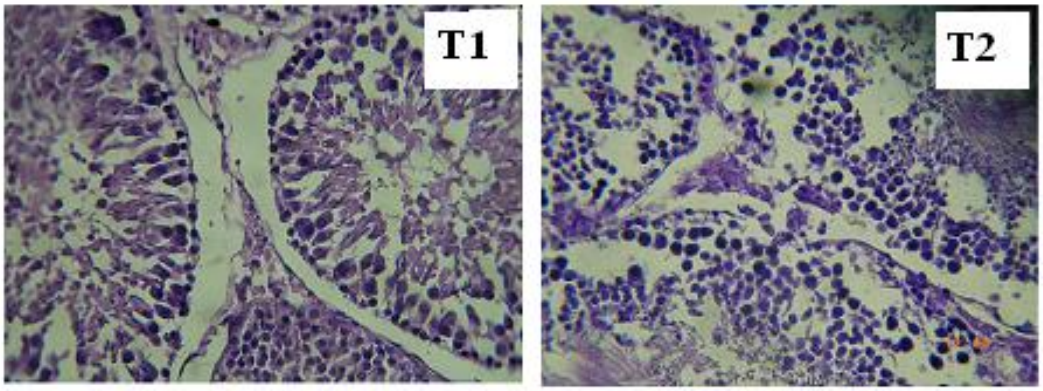


Figure 42: Coupe histologique au niveau des testicules montrant des dispositifs normaux d'apparence testiculaire chez des rats témoins (T2) et du testiculaire des rats qui ont traité oralement avec l'extrait d'*Ajuga iva* (600 mg/kg) pendant 90 jours (T1).

1. EFFETS ANTI-ARTHRITIQUES DE L'EXTRAIT D'*AJUGA IVA*

L'Arthrite Rhumatoïde est une maladie auto-immune réfractaire compliquée caractérisée par un certain nombre d'événements inflammatoires et destructifs tels que la douleur, le gonflement, l'hyperplasie synoviale, la formation de pannus, la destruction de cartilage et l'érosion de l'os (Weyand, 2000). Diverses approches thérapeutiques, se basant sur les anticorps anti-cytokines, anti-récepteurs, les transmetteurs de signal ou les cellules impliquées dans l'inflammation, ont abouti à la réduction du processus inflammatoire et destructifs de l'AR, mais n'ont entièrement pas conduit à la guérison, ce qui reflète sa complexité et la multiplicité des éléments de la pathogénie. Les travaux indiquent que les traitements visant les différentes molécules ne pourraient pas suffire pour arrêter le développement de la maladie, alors que la thérapie de combinaison, qui interfère avec les multiples cibles, pourrait être plus efficace pour le traitement du l'AR (Smolen et Steiner, 2003). À cet égard, la phytothérapie, comportant de multiples composants actifs avec de larges activités pharmacologiques représente un modèle alternatif de thérapie de combinaison qui pourrait servir aujourd'hui pour combattre plusieurs maladie dont l'AR.

L'utilisation des plantes médicinales est la forme de médecine la plus répandue à travers le monde. Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche de nouvelles substances à activité biologiques constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques. De ce fait, plusieurs travaux ont été réalisés pour l'évaluation des effets de plusieurs plantes médicinales à usage traditionnel. Dans une étude en 2008, Rajendran *et al*. ont confirmé l'efficacité d'une préparation de Siddha appelée aussi Kalpa amruthaa (KA) en améliorant le processus de l'arthrite, une nette réduction de la destruction du cartilage et l'érosion de l'os. L'étude a indiqué aussi que KA a montré une réduction profonde des activités des enzymes lysosomales. Umar *et al*. (2012) ont montré que le thymoquinone peut moduler l'effet oxydant et la réponse inflammatoire des cytokines dans l'arthrite induite par le collagène chez des rats Wistar.

La présente étude est consacrée à la recherche d'éventuels effets anti-arthritiques à partir de l'extrait méthanolique de la partie aérienne d'*Ajuga iva*. L'extraction successive de la plante d'*AI* par méthanol 85% a donné un rendement d'extraction de 15%. Ce taux est faible par rapport à celui trouvé par El-Hilaly *et al*. (2006) qui était de 25 %. La différence de solvant utilisé (eau) peut être à l'origine de la différence. Cette différence semble être liée aussi à des modifications génétiques sur la plante donc sur les composants totaux des

métabolites secondaires et aussi sur la région géographique de la plante (variation des facteurs climatiques et édaphiques), la période de récolte et les conditions de stockages.

L'analyse photochimique de l'extrait méthanolique d'*Ajuga iva* a montré des quantités importantes des polyphénols et flavonoïdes 186,3 et 34,46 mg équivalent acide gallique et de quercétine respectivement. Il faut noter que l'extrait méthanolique peut contenir aussi des substances non phénoliques telles que les sucres, les protéines, et les tannins (Markham, 1982). Les flavonoïdes et les polyphénols ont plusieurs activités biologiques telles que les propriétés antioxydantes par l'effet scavenger des radicaux libres (Nijveldt *et al*., 2001). Ces substances peuvent bloquer la production des ROS par inhibition d'enzymes productrices de ces ROS (Pietta, 2000) comme la xanthine oxydase (Middleton *et al.,* 2000; Potapovich et Kostyuk, 2003 ; Boumerfeg *et al*., 2009). Les polyphénols ont aussi des activités antibactériennes, antivirales, antiallergiques, antiulcéreuses, anticancéreuses et anti-inflammatoires (Kim *et al.,* 2002 ; Kang *et al.,* 2011).

L'arthrite a été induite par le collagène type II émulsifié avec l'adjuvant complet de Freund avec une deuxième immunisation de rappel avec l'adjuvant incomplet de Freund. Les signes de l'arthrite touchent 90% des animaux, ce qui explique l'efficacité de la méthode utilisée dans la provocation de l'arthrite. Le début et la distribution de l'arthrite étaient semblables au modèle précédemment décrit par Cremer *et al*. (1994). Les membres inférieurs sont les plus touchés au début, les autres membres viennent par la suite au cours de l'expérience. Le traitement prophylactique avec l'extrait méthanolique, commençant le premier jour de l'immunisation (jour 0), a retardé sensiblement le début de l'arthrite. En effet, le début de l'arthrite visuellement observé dans le groupe témoin positif le12^{ème} jours post-immunisations a été retardé lors du traitement avec l'EMAI dans les groupes préventifs. L'incidence de l'arthrite de 90 % dans le groupe témoin positif au 21 jour a été diminué à 60% dans le groupe traité avec la dose 60 mg/kg et le nombre moyen des pattes arthritiques au 21jours a été diminué de 2,71±1,18 dans le groupe témoin positif à 2 ± 1,14 et 1,54 ± 1,32 dans les groupes préventifs traités avec les doses 30 et 60 mg/kg.

Le traitement curatif avec l'EMAI commençant après le début de l'arthrite (14ème jour) a nettement supprimée la progression de la maladie. La sévérité de l'arthrite au jour 40 été diminués de 10.14 ± 2,08 dans le groupe témoin positif à 4 ± 1.64 et 1.14 ± 1.38 dans les groupes curatifs traites avec les doses 100 et 150 mg/kg, respectivement. Ces effets anti-arthritiques peuvent être attribués à la richesse de l'EMAI en flavonoïdes et polyphénols. En

effet, ces métabolites possèdent des effets anti-inflammatoires (Bidet *et al*., 1987; Kreofsky *et al*., 1992; Kim *et al*., 2002; Kang *et al*., 2011).

Les variations du poids des rats constituent un paramètre très important. Le suivi régulier des animaux nous a montré une différence entre la croissance des rats arthritiques. La perte du poids est significativement élevés dans le groupe témoin positif qui se déplacent difficilement et ne peuvent pas accéder à la nourriture à cause de gonflement de leurs pattes. Les groupes traités (préventifs et curatifs) par l'extrait EMAI ont montré une légère diminution dans le gain du poids pouvant être due à la difficulté de déplacement des rats ainsi que l'effet hypoglycémiant, hypolipidémiant et hypocholestérolémiant de l'*Ajuga iva,* (El-Hilaly et Lyoussi, 2002; El-Hilaly *et al*., 2006).

Les coupes histologiques ont montré un développement important de l'arthrite par des lésions dans les pattes, la plupart des rats du lot positif ont montré une destruction de cartilage et érosion d'os et une malformation des articulations. En revanche, le traitement prophylactique et curatif par l'EMAI a montré une réduction significative de l'infiltration des leucocytes dans l'espace articulaire, ce qui donne un rétrécissement de l'hyperplasie synoviale, protégeant ainsi la destruction de cartilage et l'érosion d'os.

L'activation des cellules résidentes de la membrane synoviale et le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires au niveau articulaire résulte en une libération massive de médiateurs qui contribuent à la néoangiogenèse synoviale et à la destruction ostéo-cartilagineuse. Les phénomènes de cette destruction articulaire sont principalement sous la dépendance d'enzymes secrétés par les 'fibroblast-like synoviocytes' (FLS) et les macrophages; les métalloprotéinases (MMPs), les cathepsines et de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, IL-18, TNF-α, IL-17 et le 'receptor activator of NF-κB ligand' (RANKL). Ainsi, l'IL-17 agit en synergie avec l'IL-1 et le TNFα. L'IL-17 augmente la libération d'IL-6, de chémokines (IL-8, MIP-3α), de NO et de prostaglandine (PG) E2 par les FLSs (Fossiez *et al*., 1996; Chabaud *et al*., 2001) ainsi que la libération d'IL-6, d'IL-1, de TNF-α, de NO, de PGE2 et de MMP-1, 3, 9 et 13 par les monocytes/macrophages et les chondrocytes (Jovanovic *et al.*, 1998, 2000; Koshy *et al*., 2002). L'IL-17, l'IL-1 et le TNFα sont également capables, seules et en synergie, de stimuler la résorption osseuse.

Le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) est le principal médiateur pro-angiogénique et les concentrations sériques de VEGF ont été associées à la sévérité de l'AR

(Sone, *et al.*, 2001). Ces résultats sont confirmés par des études qui ont été effectue sur des modèles animaux d'arthrite ont permis de démontrer l'efficacité de stratégies thérapeutiques ciblant ce phénomène: ainsi, l'administration d'anticorps anti-VEGF ou de récepteurs solubles du VEGF à des souris dont l'arthrite a été induite par l'injection de collagène, permet de réduire l'inflammation articulaire (Lu *et al.*, 2000; Miotla *et al.*, 2000).

Une augmentation du taux de la protéine C dans le groupe témoin positif. Des résultats similaires ont été obtenus par Mythilypriya *et al.* (2008) et Amany *et al.* (2012). Chez les animaux traités, une diminution du taux de la protéine C sérique est observée montrant que l'EMAI a inhibé l'over-expression de la protéine C dans le sérum. Moncada *et al.*, (1991); Milovanoic *et al*. (2004); Klimiuk *et al*. (2003) ont observé des valeurs élevées de CRP indicatif d'une inflammation actif dans les patients qui soufre d'une arthrite rhumatoïde. Bharadwaj *et al.*, (1999) et Mythilypriya *et al.*, (2008) ont suggéré que la CRP peut contribuer directement à l'état pro-inflammatoire en stimulant la libération des cytokines inflammatoires par les monocytes (IL-1, l'IL-6 et TNFα) et peut également agir directement comme un stimulant pro-inflammatoire des cellules phagocytaires pour produire le facteur pro-coagulant. Le taux élevé de CRP peuvent être responsables du développement de l'athérosclérose dans l'arthrite rhumatoïde (Amany *et al.*, 2012). Nos résultats indiquent que l'extrait d'*Ajuga iva* renfermerait des substances qui ont agit comme inhibiteur de la production de la CRP et ont été à l'origine du ralentissement des dommages inflammatoires communs de l'AR.

Les analyses des VS ont indiqué une différence significative entre les groupes traités et le témoin positif. L'EMAI a réduit de manière significative le niveau de vitesse de sédimentation avec les doses 30 et 60 mg/kg. La vitesse de sédimentation est une mesure indirecte de réponse de la phase chronique pour déterminer l'activité de la maladie dans l'arthrite rhumatoïde (Marcelletti *et al*., 2003).

2. EFFETS TOXIQUES DE L'EMAI

La Phytothérapie est considérée de manière erronée sans effets toxiques (Gesler, 1992). Néanmoins, ces produits contiennent des principes actifs qui ont la potentialité de causer des effets nuisibles (Eisenberg *et al.*, 1998). Ainsi, tous les produits utilisés en thérapeutique doivent être soumis aux essais d'efficacité et de sûreté par les mêmes méthodes employées pour des nouveaux médicaments (Talalay, 2001). Les études toxicologiques, exposant des animaux de laboratoire a des doses pendants des durées d'expositions variées

permettent de révéler la gamme des effets toxiques de la substance testée, ces donnes constituent la base fondamentale de l'évaluation toxicologique, en indiquant l'organe, le système cible ou la nature de la toxicité.

Des études de toxicités de l'extrait aqueux de l'*Ajuga iva* a été effectue par EL Hilaly *et al.* (2004) qui ont montré que cette plante n'a pas des effets toxiques. Pour confirmer la sureté de cette plante nous avons effectué une étude de toxicité de l'extrait méthanolique qui renfermant des molécules différentes (Markham, 1982). Pendant l'évaluation de la toxicité aiguë, aucune mortalité n'a été observé dans les doses administrées par voie orale jusqu'à la dose de 14 g/ kg, la plus forte dose qui ne provoque aucun signe de toxicité (NOAEL). L'administration de l'extrait par voie intra péritonéale a été choisie pour déterminer la toxicité, puisque les effets d'une dose orale sont sujets à la biodisponibilité systémique et à la métabolisation hépatique, par contre l'absorption par la voie intra péritonéale est souvent immédiate et complète.

Dans l'évaluation quotidienne des signes clinique, après administration par voie intra-péritonéale nous n'avons observé des changements, tels que l'hypoactivité, anorexie, et les diarrhées que chez les animaux dans les groupes qui ont été traités avec des doses supérieurs à 3 g/kg. Ces changements ont été irréversibles et persistent jusqu'à la fin de l'expérience. Les signes irréversibles d'une substance toxiques sont très importants car ils indiquent les organes les plus touchés par cette substance (Eaton et Klaassen, 1996). La plupart des études de toxicité aigue sont programmés pour déterminer la dose létale 50 (DL_{50}) de la substance qui est l'estimation statistique d'une dose unique de produit supposée tuer 50 % des animaux de laboratoire, la dose létale dans notre étude était DL_{50}= 3980 mg/kg selon la classification de Hodge et Sterner (Lu, 1992) l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva* n'est pas toxique. La différence dans la toxicité aiguë de l'EMAI observée dans la présente étude a été également rapportée pour quelques autres extraits des plantes, tels que les *scholaris d'Alstonia* (Baliga *et al.*, 2004), *afra d'armoise* (Mukinda et Syce, 2007) et *gabunensis de Cylicodiscus* (Kouitcheu *et al.*, 2007).

L'observation clinique ainsi que les résultats obtenus dans les étude de toxicité aiguë est importante avec l'activité pharmacologique étudie chez les animaux (Da Silva *et al.*, 2002; Janbaz *et al.*, 2002; lvarez *et al.*, 2004; Hasumura *et al.*, 2004) et avec la suggestion des indications thérapeutiques de l'A*juga iva* qui s'étend de doses de 10 mg/kg (El hillaly, 1994) à 100 mg/kg (lvarez *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004). Basé sur ceci, les doses à évaluer dans les

études de toxicité sub-chronique (90 jours) ont été 100, 300 mg/kg, environ 10 à 30 fois plus que la dose thérapeutique maximale indiquée (Eaton et Klaassen, 1996) et 600 mg/kg (environ 60 fois la dose thérapeutique maximale indiquée). Les observations quotidiennes sont d'importance majeure aussi bien que les observations finales (Stevens et Mylecraine, 1994; Eaton et Klaassen, 1996).

Dans l'évaluation clinique quotidienne, aucun changements dans le comportement n'a été observe chez les animaux. De plus, le changement du poids corporel est un indicateur des effets secondaires défavorables, la diminution du poids corporel est un indice simple, mais sensible des effets toxiques. Les animaux qui survivent ne doivent pas perdre plus que 10 % du poids corporel initial (Raza *et al.,* 2002; Teo *et al.,* 2002). Dans la présente étude, aucune différence significative (P>0.05) n'a été trouvée entre les lots traites et le lot témoin.

Quant aux paramètres hématologiques, l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva* n'a généralement pas interféré la formation des globules rouges et des globules blancs du sang. Exception faite pour le groupe traité par la dose 600 mg/kg où des augmentations des plaquettes et d'hémoglobine ont été observées à 60 et 90 jours. Ces valeurs passent de 524 ± 54.6 à 906.7± 33.6 pour les plaquettes et de 14.27 ± 0.67 à 16.89 ± 2.13 pour l'hémoglobine. Des observations similaires ont été faites par El Hilaly *et al*. (2004).

Dans l'évaluation des paramètres biochimique, les résultats obtenus ont montré une diminution significative de la glycémie avec tous les doses jusqu'à la fin de l'expérience. Ces résultats indiquent que l'extrait brut d'*Ajuga iva* est probablement capable de stimuler la sécrétion de l'insuline par le pancréas chez les rats (Bouderbala *et al.,* 2008). Plusieurs flavonoïdes d'*A. iva* possèdent un effet hypoglycémiant (El Hilaly, *et al*., 2004). Il n'est pas possible d'indiquer exactement le mécanisme d'action. Théoriquement, les plantes hypoglycémique peuvent agir par une variété de mécanismes, dont la stimulation de la sécrétion d'insuline, mais il a été signalé que le taux du glucose sérique peut baisser en l'absence de changement de la concentration d'insuline. Ceci suggère que l'effet hypoglycémiant puisse impliquer un mécanisme indépendant d'insuline (Dabis *et al.,* 1984), comme quelques espèces dans la même famille (Labiatae), (Jimenz *et al.,* 1986), ou dans d'autres espèces (Jouad *et al.,* 2000; Benwahhoud *et al.,* 2001). En outre, il peut agir en augmentant l'utilisation du glucose dans les tissus périphériques (Naik *et al.,* 1991; Obatomi *et al.,* 1994; Peungvicha *et al.,* 1998).

Pour les autres paramètres biochimiques, il y avait des différences significatives, de triglycéride et de cholestérol dans les lots traités par rapport au lot témoin. Ces résultats confirme les études précédente effectues par El Hilaly *et al*. (2006) et Bouderbala *et al* (2008). Les autres paramètres évalués, ASAT, ALAT, sont considérés comme des marqueurs de la fonction hépatique (Henry, 1999; Palmeiro *et al.,* 2003; Hilaly *et al.,* 2004). L'analyse de ces paramètres est important puisqu'il y a plusieurs rapports de la toxicité du foie liés à l'utilisation des produits phytotherapeutiques (Corns, 2003; Pittler et Ernst, 2003).

Dans la présente étude, on a observé des augmentations significatives en valeurs d'ASAT ($P<0.01$). Cependant, les valeurs d'ALAT, malgré que légèrement élevées, étaient toujours dans la marge normale. Les examens histo-pathologiques nécessaires dans le cas des augmentations des ASAT et/ou ALAT (Henry, 1999; Palmeiro *et al.,* 2003; Hilaly *et al.,* 2004; Kanjanapothi *et al.,* 2004), n'ont pas confirmé l'atteinte hépatique. L'ALAT est situé principalement dans le cytosol des hépatocytes, cette enzyme est considérée un marqueur plus sensible des dommages des cellules hépatiques que l'ASAT. AST est une enzyme trouvée dans le cytoplasme et les mitochondries dans différents tissus, principalement dans le cœur et les muscles squelettiques, le foie, les reins, le pancréas, et les érythrocytes (Chaves et Silva, 1998; Aniagu, *et al.,* 2004).

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Dans notre travail, nous avons réussi à provoquer l'arthrite avec du collagène type II chez les rats Albinos Wistar et suivre son développement, ainsi que leur traitement par l'extrait d'*Ajuga iva*, dans un but préventif et curatif.

A la lumière des résultats, on peut conclure que l'*Ajuga iva* appelée Chendgoura a un effet anti-inflammatoire. Les tests biologiques réalisés sur les rats Wistar ont prouvé l'efficacité de la plante étudiée contre l'arthrite rhumatoïde. Ce travail a prouvé l'effet important de l'EMAI dans le traitement de l'arthrite induite chez le rat, mais ne peut pas renseigner sur le mécanisme réel par lequel agit l'extrait méthanolique pour diminuer l'apparition des signes de l'arthrite. Par conséquent, la réalisation des études ultérieures sur des cellules isolées ou sur une autre espèce animale est d'une importance cruciale. Ceci sera enrichissant et peut nous conduire à la découverte de nouvelles substances à activité anti-inflammatoire. La réalisation des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques pour mieux comprendre les sites d'action des substances actives. La contribution à la recherche de propriétés anti-inflammatoires à partir de l'extrait d'*Ajuga iva* reste introductive. Celle-ci constitue une estimation qui pourrait également, prévenir plusieurs maladies hors la polyarthrite rhumatoïde.

L'étude de toxicité aigue de l'extrait méthanolique chez les souris montre que *Ajuga iva* semble être sure et sans effet toxique jusqu'à la dose la plus élevée qui ne provoque pas des effets toxique (NOAEL) qui est 14g/kg. L'étude de toxicité subaigüe (90 jours) a montré que l'extrait est non toxique avec quelques signes indésirables tels que l'augmentation des GOT et GPT.

Ces résultats confirment la validité de l'indication traditionnelle de la plante dans le traitement de plusieurs maladies telles que le diabète, l'hypercholestérolémie, l'hyper-lipidémie et l'arthrite dans la perspective de la mise au point d'un médicament pour la prise en charge des malades arthritiques.

Références bibliographiques

Aarvak T., Natvig J.B. (2001). Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **3**:13–17.

ACRAG, 2002 American College of rheumatology subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. 2002 update. *Arthritis Rheum*;**46**:328–46.

Adarichev V.A. et al. (2003).Combined autoimmune models of arthritis reveal shared and independent qualitative (binary) and quantitative trait loci. *J Immunol* **170**: 2283-2292.

Alexeeff G.V., Broadwin R., Liaw J., Dawson S.V., (2002). Characterization of the LOAEL-to-NOAEL uncertainty factor for mild adverse effects from acute inhalation exposures. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **36:** 96–105.

Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Brown C.B., Kaushansky K., Firestein GS. (1991). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocytemacrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **146**:3365–11371.

Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Firestein G.S. (1990). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon-gamma and tumor necrosis factoralpha on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colonystimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *J Clin Invest.* **86**:1790–1798.

Amany A., Abdin Mahmoud S., Sabiha E., Amira A.E., et al. (2012).Effect of atorvastatin with or without prednisolone on Freund's adjuvant induced-arthritis in rats *European Journal of Pharmacology* **676:** 34–40.

Andersen L.A., Ibfelt H.H., Christensen K., et al. (2000). Randomized, placebo-controlled, cross-over study of ginger extracts and ibuprofen in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **8**(1):9

Andersson M,. Holmdahl R. (1990). Analysis of type II collagen-reactive T cells in the mouse. I. Different regulation of autoreactive vs. non-autoreactive anti-type II collagen T cells in the DBA/1 mouse. *Eur. J. Immunol*. **20** (5) :1061–1066.

Aniagu S.O., Nwinyi F.C., Olanubi B., Akumka D.D., Ajoku G.A., Izebe K.S., Agala P., Agbani E.O., Enwerem N.M., Iheagwara C., Gamaniel K.S. (2004). Is Berlina grandiflora (Leguminosae) toxic in rats. *Phytomedicine* **11:** 352–360.

Atouf O., Benbouazza K., Brick C., Bzami F., Bennani N., Amine B., et al. (2008). HLA polymorphism and early rheumatoid arthritis in the Moroccan population. *Joint Bone Spine*;**75**:554-8.

Avouac J., Uzan G., Kahan A., Boileau C., Allanore Y. (2008). Endothelial progenitor cells and rheumatic disorders. *Joint Bone Spine*;**75**:131-7.

Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Din T., Vasseur J., Gazin J. C., Pinkas M., Luyckx M., Gazin M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from howthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittelforschung/Drug Research*, **46(2):** 1086 – 1089.

Baliga M.S., Jagetia G.C., Ulloor J.N., Baliga M.P., Venkatesh P., Reddy R., Rao K.V., Baliga B.S., Devi S., Raju S.K., Veeresh V., Reddy T.K., Bairy K.L., (2004). The evaluation of the acute toxicity and long term safety of hydroalcoholic extract of Sapthaparna (*Alstonia scholaris*) in mice and rats. *Toxicology Letters;* **151:** 317–326.

Bang L.M., Keating G.M. (2004). Adalimumab : a review of its use in rheumaoid arthritis. *Bio Drugs*. **18**(2):121-39.

Batanouny K.H., Abou Tabl S., Shabana M., Soliman F. (1999). Wild medicinal plants in egypt. *Academy of Scientific Research and Technology*. International Union for Conservation (IUCN). Egypt.

Batteux F., **Weill B.**(2003). Immun-pathologie et réactions inflammatoires. *Ed: Boeck*. Pp: 71.

Ben Jannet H., Al Mourabit A., Gateau-Olesker A., Marazano C., Mighri Z. (1999). Enantioselective synthesis of natural biologically active ivaide A: 1,3-di-(*R*)-â hydroxyglyceride glycerol. *Tetrahedron Asymmetry* **10**: 2381-2386.

Ben Jannet H., Harzallah-skhiri F., Mighri Z., Simmonds M.S., Blaney W.M. (2000). Responses of *Spodoptera littoralis* larvae to Tunisian plant extracts and to neo-clerodane diterpenoids isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves. *Fitoterapia* **71** : 105-112.

Ben Jannet H., Skhiri F.H., Mighri Z., Simmonds M.S.J., Blaney W.M. (2001) Antifeedant activity of plant extracts and of new natural diglyceride compounds isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves against *Spodoptera littoralis* larvae. *Industrial Crops and Products* **14 :** 213–222.

Benard C. (2009) **:** Polyarthrite rhumatoïde. Clinique et diagnostique service d'immun rhumatologie,*Etudes approfondies des polyarthrites et maladies systémiques*, p 30.

Bendele A.M. (2001) **Animal models of rheumatoid arthritis J Musculoskel Neuron Interact**. **1(4):**377-385

Bennaghmouch, L., Hajjaji, N., Zellou, A., Cherrah, Y. (2001). Pharmacological study of *Ajuga iva*. *Annales Pharmaceutiques Francaises* **59 :** 284.

Benwahhoud, M., Jouad, H., Eddouks, M., Lyoussi, B.(2001). Hypoglycaemic effect of *Suaeda fructicosa* in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **76 (1):** 35–38.

Berek C., Schroder A.E. (1997).A germinal center-like reaction in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane. *Ann N Y Acad Sci*; **815**:211–217.

Berenbaum F., Humbert L., Bereziat G., Thirion S. (2003). Concomitant recruitment of ERK1/2 and p38 MAPK signalling pathway is required for activation of cytoplasmic phospholipase A2 via ATP in articular chondrocytes. *J Biol Chem*; **278**:13680–13687.

Berthelot, M.P.E.(1959) Report Chim. Appl. 284.

Bessis, D. (2007). Manifestations des connectivites, vasculites et affections systémiques apparentées. *Ed: Springer*. Pp: 13-14.

Beyaert R., Cuenda A., Vanden Berghe W., Plaisance S., Lee J.C., Haegeman G., et al. (1996).The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *Embo J*; **15**: 1914–1923.

Bharadwaj D., Stein M.P., Vozer M., Mold C., Du Clos T.W. (1999). The major receptor for C reactive protein on leukocytes is FC-γ receptor II. *J. Exp. Med*. **190:** 585 590.

Bidet D., Gaignault J.C., Girard P., Trotin F. (1987).Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique : Les flavonoïdes. *L' actualité chimique* , p. 89 - 97.

Billiau A., Matthys P., (2011) Collagen-induced arthritis and related animal models: How much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? *Cytokine & Growth Factor Reviews* **22** : 339–344

Billingham M.E.J. (1995). Adjuvant arthritis: the first model. *Academic Press*, London, 389–409.

Bondì M.L., Al-Hillo M.R.Y., Lamara K., Ladjel S., Bruno M., Piozzi F. and Simmonds M.S.J. (2000). Occurrence of the antifeedant 14,15-dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria. *Biochemical Systematics and Ecology* **28**: 1023-1025.

Bongartz T., Sutton A.J., Sweeting M.J., Buchan I., Matteson E.L., Montori V. (2006). Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infection and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA*; 295: 2275–85.

Bonnevialle P., Cantagrel A., Gigaud M ., Mansat P. (2001) Chirurgie de la polyarthrite rhumatoïde *Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, Appareil locomoteur,* **B-10 :** 14-222

Bouderbala S., Lamri-Senhadjia M., Prostb J., Lacaille-Duboisc M.A. and Bouchenak M. (2008). Changes in antioxidant defense status in hypercholesterolemic rats treated with *Ajuga iva*. *Phytomedicine* **15** : 453-461.

Brand, D.D., Kang, A.H., Rosloniec, E.F, (2003). Immunopathogenesis of collagen arthritis, *Springer Semin. Immunopathol.* **25** (1): 3–18.

Braun J, Kästner P., Flaxenberg P., Währisch J., Hanke P., Demary W., et al. (2008). Comparison of the clinical efficacy and safety of subcutaneous versus oral administration of methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis: results of a six months, multicenter, randomized, double mind, controlled, phase IV trial. *Arthritis Rheum*; **58**:73–81.

Brazier J.L., (2003) Des produits naturels pour traiter l'arthrite. *le clinicien* 82- 87.

Breedveld F.C., Kalden J.R. (2004). Appropriate and effective management of rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis;**63**:627–33.

Breedveld F.C., Weisman M.H., Kavanaugh A.F., Cohen S.B., Pavelka K., van Vollenhoven R., et al. (2006). The PREMIER study: A multicenter, randonized, double-mind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early aggressive rheumatoid arthritis who had no previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum*;**54**: 26–37.

Brennan P., Silman A. (1994). Breast-feeding and the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **37**:808–813.

Brentano F., Kyburz D., Schorr O., Gay R., Gay S. (2005). The role of Toll like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol*. **233**:90-6.

Bresnihan B., Alvaro-Gracia J.M., Cobby M., Doherty M., Domljan Z., Emery P., et al. (1998). Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*; **41**:2196–2204.

Brousse C. (2003).Les inhibiteurs du TNFα. *Rev Med Interne*;**24**:123-126.

Buchs N., di Giovine F.S., Silvestri T., Vannier E., Duff G.W., Miossec P. (2001). IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes Immun*;**2**:222–228.

Buchs N., Silvestri T., di Giovine F.S., Chabaud M., Vannier E., Duff G.W., et al. (2000). IL-4 VNTR gene polymorphism in chronic polyarthritis. The rare allele is associated with protection against destruction. *Rheumatology*; **39**:1126–1131.

Busso N. et al. Exacerbation of antigen-induced arthritis in urokinase-deficient mice. *J Clin Invest* **102**: 41-50 (1998).

Calguneri M., Pay S., Caliskaner Z. et al. (1999) Combinaison therapy versus monotherapy for the treatement patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumtol*;**6:** 699-704.

Calogero A.E., Sternberg E.M., Bagdy G., Smith C., Bernardini R., Aksentijevich S., et al., (1992) Neurotransmitter-induced hypothalamic–pituitary–adrenal axis responsiveness is defective in inflammatory disease-susceptible Lewis rats: in vivo and in vitro studies suggesting globally defective hypothalamic secretion of corticotropin-releasing hormone, *Neuroendocrinology* **55 (5):** 600–608.

Campbell I.K., Hamilton J.A., Wicks I.P. (2000). Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* **30**, 1568-1575

Cao D., Malmstrom V., Baecher-Allan C., Hafler D., Klareskog L., Trollmo C. (2003) Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*;**33**:215–223.

Capell H.A., Madhoc R., Hunter J.A., Porter D., Morrisson E., Larkin J., et al. (2004) Lack of radiological and clinical benefit over two years of low dose prednisolone for rheumatoid arthritis: results of a randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis*;63:797–803.

Carli P., Landais C., Aletti M., Cournac J.M., Poisnel E., Paris J.F. (2009) Mouvement thérapeutique :Traitement actuel de la polyarthrite rhumatoïde. *La Revue de médecine interne* **30** : 1067–1079.

Caron J.L., Allan Petterson(2007). Dessin, douleur et musique : la vie et l'œuvre. Pp: 179-180.

Cascão, R., Vidal, B., Raquel, H., Neves-Costa, A., Figueiredo, N., Gupta, V., Moita, L.F. (2012). Effective treatment of rat adjuvant-induced arthritis by celastrol *Autoimmunity Reviews* **1244:** 7.

Case J.P., Lafyatis R., Remmers E.F., Kumkumian G.K., Wilder R.L.(1989) Transin/stromelysin expression in rheumatoid synovium. A transformation-associated metalloproteinase secreted by phenotypically invasive synoviocytes. *Am J Pathol*;**135**:1055–1064.

Chabaud M., Aarvak T., Garnero P., Natvig J.B., Miossec P. (2001). Potential contribution of IL-17-producing Th(1)cells to defective repair activity in joint inflammation: partial correction with Th(2)-promoting conditions. *Cytokine*;**13**:113–118.

Chabaud, M., Fossiez, F., Taupin, J.L., Miossec, P. (1998). Enhancing effect of IL-17 on IL- 1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines. *J Immunol* **161(1**): 409-14.

Chabaud, M., Page, G., Miossec, P. (2001). Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol* **167(10) :** 6015-20.

Champy V., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev Rhum* **74:** 636-43.

Chen H., Tan R.X., Liu Z.L., Zhang Y., Yang L. (1996). Antibacterial neoclerodane diterpenoids from *Ajuga lupulina*. *Journal of Natural Products* **59:** 668–670.

Chenni A., Ait Yahia D., Boukortt F.O., Prost J., Lacaille-Dubois M.A. and Bouchenak M. (2007). Effect of aqueous extract of *Ajuga iva* supplementation on plasma lipid profile and tissue antioxidant status in rats fed a high-cholesterol diet. *J. Ethnopharmacol.* **109:** 207-213.

Choy E.H., Isenberg D.A., Garrood T., Farrow S., Ioannou Y., Bird H., et al. (2002) Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, doubleblind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum*;**46**:3143–3150.

Christina Charles-Schoeman., Mona Lisa Banquerigo., Susan Hama., MohamadNavab., Grace S. Park, Brian J. Van Lentenb, Alan C. Wagner , Alan M. Fogelman, Ernest Brahn. (2008). Treatment with an apolipoprotein A-1 mimetic peptide in combination with pravastatin inhibits collagen-induced arthritis*Clinical Immunology* **127**: 234–244.

Chrubasik S., Eisenberg E., Balan E., et al. (2000).Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: A randomized double-blind study. *Am J Med* **109**(1):9

Chrubasik S., Thanner J., Kunzel O., et al (2002). Comparison of outcome measures during treatment with the proprietary Harpagophytum extract doloteffin in patients with pain in the lower back, knee or hip. *Phytomedicine* **9(3):**181,

Coffer C. (2011). Polyarthrite rhumatoïde. *Collège Français des Enseignants Universitaires de Médecine Physique et de Réadaptation* **121 :**30.

Cohen S.B., Emery P., Greenwald M.W., Dougados M., Furie R.A., Genovese M.C., et al. (2006). Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: results of a multicenter, randomized, double-blinded, placebo controlled phase

III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. Arthritis rheum; **54**:2793–806.

Collin-Osdoby P., Rothe L., Anderson F., Nelson M., Maloney W., Osdoby P. (2001). Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem*; **276** :20659–20672.

Combe B . (2007). Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte. Aspects cliniques. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale Masson,Paris*,14-220-A-10.

Combe B. (2002). Traitements anti-« tumor necrosis factor » dans la polyarthrite rhumatoïde. *EMC, Appareil locomoteur*; Fa 14-220-A-20.

Combe B., Eliaou J.F., Meyer O., Clot J., Sany J.(1995). Prognostic factors in rheumatoid arthritis. Comparative study of two subsets of patients according to severity of articular damage. *Br J Rheumatol*;**34**:529–534.

Corns, C.M. (2003). Herbal remedies and clinical biochemistry. *Annals of Clinical Biochemistry* **40:** 489–507.

Cremer M.A., Ye X.J., Terato K., Owens S.W., Seyer J.M., and Kang A.H. (1994). Type XI collagen-induced arthritis in the Lewis rat: Characterization of cellular and humoral responses to native types XI, V and II collagen and constituent α-chains. *J. Immunol.* **153**: 824-832.

Cutolo M., Seriolo B., Villaggio B., Pizzorni C., Craviotto C., Sulli A. (2002). Androgens and estrogens modulate the immune and inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*;**966**:131–142.

Da Silva, J., Herrmann, S.M., Heuser, V., Peres, W., Marroni, N.P., Gonzalez-Gallego, J., Erdtmann, B. (2002). Evaluation of the genotoxic affect of rutin and quercetina by comet assay and micronucleus test. Food and Chemical Toxicology **40,** 941–947.

Dabis G., Michon D., Gazenav J., Ruffie A.(1984). Interets cliniques d'une strategie biologique adaptee au diabete sucré. La vie Medicale **8 (2),** 277–290.

Damle N.K., Eberhardt C., Van der Vieren M. (1991). Direct interaction with primed CD4+ CD45R0+ memory T lymphocytes induces expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on the surface of vascular endothelial cells. *Eur J Immunol*; **21**:2915–2923.

Dayer J.M., Cutolo M. (2005). Is there a rationale to using leflunomide in early rheumatoid arthritis? Clin Exp Rheumatol;23:404–12.

Dayer J.M., de Rochemonteix B., Burrus B., Demczuk S., Dinarello C.A. (1986). Human recombinant interleukin 1 stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells. *J Clin Invest*;**77**:645–648.

De Franco M., Gille-Perramant M.F., Mevel J.C., Couderc J. (1995).T helper subset involvement in two high antibody responder lines of mice (Biozzi mice): HI (susceptible) and HII (resistant) to collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* **25** : 132-136.

De Vita S., Zaja F., Sacco S., De Candia A., Fanin R., Ferraccioli G. (2002). Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogenetic role of B cells. *Arthritis Rheum*;**46**:2029–2033.

Di Paola R., Cuzzocrea S. (2008). Predictivity and sensitivity of animal models of arthritis Autoimmunity Reviews 8 73–75

Ditzel H.J. (2004).The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis. *Trends Mol Med* **10:** 40-45

Doffoel-Hantz V., Loustaud-Ratti V., Ramos-Cassals M., Alain S., Vidal E. (2005). Evolution des syndromes de Gougerot-Sjogren associés au virus de l'hépatite C sous interféron et l'association interféron- ribavirine. *Rev Med Interne*; **26:**88-94.

Dubucquoi S., Fily-Nalewack S. (2008). Prise en charge de la polyarthrite rhumatoïde en 2008 : la biologie peut elle répondre aux attentes des cliniciens . *Rev Fr Lab* **404**:51-7.

Eaton, D.L., Klaassen, C.D. (1996). Principles of toxicology. In: Klaassen, C.D. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 5th ed. McGraw-Hill, New York, p. 13.

Edwards J.C. (2000). Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Res*;**2**:344–347.

Edwards J.C., Szczepanski L., Szechinski J., Filipowicz-Sosnowska A., Emery P., Close D.R., et al. (2004). Efficacity of B-cell targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J med*;**350:** 2572–81.

Eisenberg D.M., Davis R.B., Ettener S.L. (1998). Trends in alternative medicine use in the United States, 1990–1997: results of a follow-up national survey. The Journal of the American Medical Association **280:** 1569–1575.

Eisenberg R., Fox A., Greenblatt J.J., Anderle S.K., Cromartie W.J., Schwab J.H. (1982). Measurement of bacterial cell wall in tissues by solid-phase radioimmunoassay: correlation of distribution and persistence with experimental arthritis in rats, *Infect. Immun.* **38**: 127–135.

El Hilaly J., Lyoussi B. (2002). Hypoglycaemic effect of the liophilised aqueous extract of *Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **80**: 109-113.

El Hilaly J., Lyoussi B.,Wibo M. and Morel N. (2004). Vasorelaxant effect of the aqueous extract of *Ajuga iva* in rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* **93**: 69-74.

El-Hilaly J., Tahraoui A., Israili Z.H., Lyoussi B. (2006).Hypocholesterolemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajugaiva*L. whole plant in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **105:** 441-448.

EL-Hilaly, J., Hmammouchi, M., Lyoussi, B. (2003).Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plant in Taounate province (Northern Morocco). J Ethnopharmacol **86** : 149-158.

Eliaou J.F., Andary M., Favier F., Carayon P., Poncelet P., Sany J., et al. (1988). Increase of class II HLA molecules on the membrane of B lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*; **1**:217–222.

Emery P., Breedveld F.C., Hall S., Durez P., Chang D.J., Robertson D., et al. (2008). Comparison of methotrexate monotherapy with combination of methotrexate and etanercept in active, early, moderate to severe rheumatoid arthritis (COMET): a randomised, double-mind, parallel treatment trial. *Lancet*;**372**:375–82.

Emery P., Keystone E., Tony HP., Cantagrel A., van Vollenhoven R., Sanchez A., et al. (2008). IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor. Results from a 24-weeks multicentre randomized placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*;**67**:1516–23.

Emery P., Salmon M., Bradley H., Wordsworth P., Tunn E., Bacon P.A., et al. (1992). Genetically determined factors as predictors of radiological change in patients with early symetrical arthritis. *Br Med J* **305**:1387–1389.

Emmanuel B. (2009). Rhumatologie Polyarthrite rhumatoïde La Collection Hippocrate*ÉpreuvesClassantes Nationales* **1** : 8-121.

Essakalli M., Atouf O., Bennani N., Benseffaj N., Ouadghiri S., Brick C. (2008). Toll Like receptor. Pathol Biol doi:10.1016/j.patbio..04.003.

Essakallia M., Benseffaja N., Atoufa O., Bricka C . (2011). La polyarthrite rhumatoïde :un vieux système dans un nouveau concept. *Revue Francophone Des Laboratoires* **436 :** 51- 58.

Eyquem A et de Saint Martin J. (1981). Immuno rhumatologie. Rhumatisme lupus érythémateux disséminé connectivites 2éme Ed. Moloine S.A. pp121-186.

Eyquem A., Alouf J., Montagnier L. (2000). Traité de microbiologie clinique: deuxième mises à jour et compléments. *Ed: PiccinNouvaLibraria S.P.A.* Pp: 110.

Falgarone G., Duclos M., Boissier M.C. (2007). Anti-TNF dans la polyarthrite rhumatoïde et pratique courante. *Rev Rhum*;**74**:1227–30.

Falgarone G., Jaen O., Boissier M.C. (2005). Rôle de l'immunité innée dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum* **72**:17-26.

Feldmann M., Maini R.N. (2001). Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*;**19**:163–196.

Fiebich B.L., Heinrich M., Hiller K.O., et al. (2001). Inhibition of TNF-alpha synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by Harpagophytum extract SteiHap 69. *Phytomedicine* **8(1):**28.

Finckh A., Dehler S. (2009).The effectiveness of leflunomide as a co-therapy of tumour-necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis: a population based study. *Ann Rheum Dis* 68:33–9.

Firestein G.S., Manning A.M. (1999). Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis Rheum*;**42**: 609–621.

Firestein G.S., Zvaifler N.J. (1990). How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum*;**33**: 768–773.

Firestein GS. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis.*Nature*;**423**: 356–361.

Fleischmann P.M., racewicz A.J., Schectman J., et al. (2005). Rituximab efficacy in rheumatoid arthritis is independent of coadministration of glucocorticoids: results from the Dose Ranging Assessment International Clinical evaluation of Rituximab in Rheumatoid Arthritis (DANCER) study. *Arthritis Rheum.* **52**(9):130-131.

Fossiez F., Djossou O., Chomarat P., Flores-Romo L., Ait-Yahia S., et al. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* **183(6**), 2593-603.

Furst D.E., Breedveld F.C., Kalden J.R., et al. (2004). Updated consensus statement on biological agents, specifically tumour necrosis factor alpha (TNFα) blocking agents and Il-1 receptor antagonist (Il-1ra), for the treatment of rheumatic diseases, 2004. *Ann Rheum Dis*; **63** (Suppl 2): ii 2-ii 12.

Furst D.E., Keystone E.C., Kirkham B., Fleischmann R., Mease P., et al. (2008). Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*;**67** (3): 2–25.

Geis G.S. (1999) Update on clinical developments with celecoxib, a new specific COX-2 inhibitor: what can we expect? *Scand. J. Rheumatol*. Suppl. **109:** 31–37.

Genant H.K., Peterfy C.G., Westhovens R., Becker J.C., Aranda R., Vratsanos G., et al. (2008). Abatacept inhibits progression of structural damage in rheumatoid arthritis: result from the long term extension of the AIM trial. *Ann Rheum Dis*; **67**:1084–9.

Genovese M.C., Bathon J.M., Martin R.W., Fleischmann R.M., Tesser J.R., Schiff M.H., et al. (2002). Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: two-year radiographic and clinical outcomes. *Arthritis Rheu m*; **46**:1443–1450.

Genovese M.C., Becker J.C., Schiff M., Luggen M., Sherrer Y., Kremer J., et al. (2005). Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. N Engl J Med;**353**:1114–23.

Genovese M.C., Mc Kay J.D., Nasonov E.L, Mysler E.F, Da Silva N.A., Alecock E., et al. (2008a). Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying anti-rheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum;***58**:2968–80.

Genovese M.C., Schiff M., Luggen M., Becker J.C., Aranda R., Teng J., et al. (2008b). Efficacy and safety of the selective co-stimulation modulator abatacept following 2 years of treatment in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to an anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis*;**67**:547–54.

Gesler W.M., (1992). Therapeutic landscapes: medical issues in light of the new cultural geography. Social Science and Medicine ; **34 :** 735– 746.

Ghedira k. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*; **3 (4)** : 162-169.

Ghedira K., Chemli R., Richard B., Zeches M., Le-Men-Olivier L. (1991). Contribution à l'étude de la pharmacopée traditionnelle de Tunisie: étude des parties aériennes d'*Ajuga iva* (L.) Schreb. *Plantes Medicinales et Phytotherapie;* **25** :100-111.

Ghosh M.N. (1984). Fundamentals of Experimental Pharmacology. *Scientific Book Agency, Calcutta*, p. 153.

Goekoop-Ruiterman Y.P., de Vries-Bouwstra J.K, Allaart C.F., van Zeben D., Kerstens P.J., Hazes J.M., et al. (2005). Clinical and radiographic outcomes of four different treatment strategy in patient with early rheumatoid arthritis (the BeST study): randomised, controlled trial. *Arthritis Rheum*;**52:** 3381–90.

Goodson T., Morgan S.L., Carlee J.R., Baggott J.E., (2003) The energy cost of adjuvant-induced arthritis in rats, *Arthritis Rheum.* **48 (10)** : 2979–2982.

Gough A.K., Faint J., Salmon M., Hassel A., Wordsworth P., Pilling D., et al. (1994). Genetic typing of patients with inflammatory arthritis at presentation can be used to predict outcome. *Arthritis Rheum*;**37**:1166–1170.

Graham H.D. (1992). Modified Prussian Blue assay for total phenols. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **40**: 801-805.

Grandjean F., Berlage V., Auger L., Robert F., Vankerkhoven P., Cirriez J.M. (2006). High sensitivity CRP, two approaches *Immuno-analyse&Biologiespécialisée* **21:** 168–171.

Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J. (1987).The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*;**30**:1205–1213.

Griffiths M.M. (1988). Immunogenetics of collagen-induced arthritis in rats, *Int. Rev. Immunol*. **4 (1):** 1–15.

Griffiths RH. (2008). Is the generation of neo-antigenic determinants by free radicals central to the development of autoimmune rheumatoid disease? *Autoimmun Rev*;**7:**544-9.

Grigor C., Capell H., Stirling A., MacMahon A.D., Lock P., Vallance R., et al. (2004). Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA Study): a single-blind randomised controlled trial. *Lancet* **364**:263–9.

Guillemin F., Saraux A., Guggenbuhl P., Roux CH., Fardellone P., Le Bihan E. (2005**).** Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Ann Rheum Dis.***64**: 1427-30.

Halimi A.K. (2004). Les plantes médicinales en Algérie. 1ère édition. *BERTI Editions*, Alger.Pp : 156-157.

Haqqi T.M., Anthony D.D., Gupta S., Ahmad N., Lee M.S., Kumar G.K., et al. (1999). Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. ***96***: 4524–4529.

Hegen M., Keith J.C., Collins, M., Nickerson-Nutter, C.L. (2008).Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **67**: 1505- 1515.

Herlaar E., Brown Z. (1999). p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today*;**5**:439–447.

Hill J.A., Southwood S., Sette A., Jevnikar A.M., Bell D.A., Cairns E. (2003). The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol*;**171**: 538–541.

Hirohata S., Yanagida T., Itoh K., Nakamura H., Yoshino S., Tomita T., Ochi T. (1996). Accelerated generation of CD14+ monocyte-lineage cells from the bone marrow of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum;* **39(5):** 836-843.

Hofbauer L.C., Heufelder A.E. (2001). Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*;**79**: 243–253.

Hofbauer L.C., Khosla S., Dunstan C.R., Lacey D.L., Boyle W.J., Riggs B.L. (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*;**15**:2–12.

Hofbauer L.C., Lacey D.L., Dunstan C.R., Spelsberg T.C., Riggs B.L., Khosla S. (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*; **25**:255–259.

Jacobs J.P., Wu H.J., Benoist C., Mathis D. (2009). IL-17-producing T cells can augment autoantibody-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106:** 21789-21794

Jacobs J.W. (1992). Opinions of patients with reumatoid arthritis about their own functional capacity. How valid is it? *Ann Rheum Dis*; **51(6):**765-8.

Jalkanen S., Steere A.C., Fox R.I., Butcher E.C. (1986). A distinct endothelial cell recognition system that controls lymphocyte traffic into inflamed synovium. *Science* **233**: 556–558.

Janbaz K.H., Saeed S.A., Gilani A.H.(2002). Protetive effect of rutin on paracetamol- and CCl4-induced hepatotoxicity in rodents. Fitoterapia **73 :** 557–563.

Ji H. et al. (2002a). Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* **16**: 157- 168.

Ji H. et al. Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med* **196**: 77-85 (2002b).

Jiang Y., Genant H.K., Watt I., Cobby M., Bresnihan B., Aitchison R., et al. (2000). A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum*; **43**:1001–1009.

Jimenz J., Risco S., Ruiz T., Zaruelo A.(1986). Hypoglyceamic activity of Salvia lavandulifolia. *Planta Medica* **4:** 260–262.

Jovanovic D.V., Di Battista J.A., Martel-Pelletier J., Jolicoeur F.C., He Y., Zhang M., Mineau, F., Pelletier, J.P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of

proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* **160(7):** 3513-21.

Jovanovic D.V., Martel-Pelletier J., Di Battista J.A., Mineau F., Jolicoeur F.C., Benderdour M., Pelletier J.P. (2000). Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43(5):** 1134-44.

Kang N.J., Shin S.H., Lee H.J., Lee K.W. (2011). Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis, *Pharmacol. Ther.* **130**: 310–324.

Kanjanapothi D., Panthog A., Lertprasertsuke N., Taesotikul, T., Rujjanawatw C., Kaewpinit D., Sudthayakorn R., Choochote W., Chaithong U., Jitpakdi A., Pitasawat B.(2004). Toxicity of crude rhizome extract of *Kaempferia galanga* L. (Proh Hom). *Journal of Ethnopharmacology* **90:** 359–365.

Kannan K., Ortmann R.A., Kimpel D. (2005). Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology* **12**: 167-181.

Kanp-Sung, K., Yoo-Haeng, C., Kyung-Ho, K., Young-Choon, L.,Cheorl-Ho, K., Sang Ho, M., Seung-Goo, K., Young-Guk P. (2004). Protective and anti-arthritic effects of deer antler aqua acupuncture (DAA), inhibiting dihydroorotate dehydrogenase, on phosphate ions mediated chondrocyte apoptosis and rat collagen-induced arthritis *International Immunopharmacology* **4:** 963–973**.**

Kariba, R.M. (2001). Antifungal activity of *Ajuga remota*. *Fitoterapia* **72:** 177–178.

Keystone E., Emery P., Peterfy C.G., Tak P.P., Cohen S., Genovese M.C., et al. (2009). Rituximab inhibits structural joint damage in patients with rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitor therapies. *Ann Rheum Dis* ; **68:**216–21.

Kim D.O., Lee K.W., Lee H.J., Lee C.Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 3713-3717.

Kim H.J., Berek C. (2000). B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*;**2**:126–131.

Kim H.P., Son K.H., Chang H.W., Kang S.S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellularactionmecanisms.*Journal of Pharmacological Sciences*. **96 (3):** 229-245.

Kim W.U. et al. (2004). Type II collagen autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Am J Med Sci* **327**, 202-211.

Kimpel D., Dayton T., Fuseler J., Gray L., Kannan K., Wolf R.E. et al., (2003) Splenectomy attenuates streptococcal cell wall-induced arthritis and alters leukocyte activation, *Arthritis Rheum*. **48 (12):** 3557–3567.

Kimpel D., Dayton T., Kannan K., Wolf R.E. (2002) Streptococcal cell wall induced arthritis: leukocyte activation in extra-articular lymphoid tissue, *Inflammation* **27 (2):** 59–70.

Kirwan J. (2007) Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoidarthritis. *Cochrane Libr*;**1:** CD006356.

Kitamoto Y., Nakamura E., Tokunaga H., Murakami I., Imamura T. (2008). Thrombin in synovial fluid as a marker of synovial inflammation: A definite measurement by ELISA and correlation with VEGF. *Clin Chim Acta*; **398:**159-60.

Klareskog L., Catrina A.I., Paget S. (2009) Rheumatoid arthritis. *Lancet*; **373**: 659-72.

Klimiuk P.A., Sierakowski S., Chwiecko J. (2003). Serum interleukin 6 (Il-6) concentration correlates with matrix mettaloproteinases and their tissue inhibitors in rheumatoid arthritis. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **109:** 119–123.

Klinman D. (2003). Does activation of the innate immune system contribute to the development of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum*;**48**: 590–593.

Knight B., Katz D.R., Isenberg D.A., Ibrahim M.A., Le Page S., Hutchings P., et al. (1992) . Induction of adjuvant arthritis in mice, *Clin. Exp. Immunol*. **90** (3): 459–465.

Korganow A.S. et al. (1999). From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* **10**: 451-461.

Korganow A.S., Fournier C., Pasquali J.L., Martin T. (1996). Place du système immunitaire dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *Méd Thér*;**2**: 267–274.

Koshy P.J., Henderson N., Logan C., Life P.F., Cawston T.E., Rowan A.D. (2002). Interleukin 17 induces cartilage collagen breakdown: novel synergistic effects in combination with proinflammatory cytokines. *Ann Rheum Dis* **61(8):** 704-13.

Kouitcheu M.L.B., Beng V., Kouam J., Essame O., Etoa F.X. (2007). Toxicological evaluation of ethyl acetate extract of *Cylicodiscus gabunensis* stem bark (Mimosaceae). J Ethnopharmacol **111:** 598-606.

Kremer J.M., Dougados M., Emery P., Durez P., Sibilia J., Shergy W., et al. (2005). Treatment of rheumatoid arthritis with the selective costimulation modulator abatacept: twelve-month results of phase IIB, double mind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*; **52**:2263–71.

Kremer J.M., Genant H.K., Moreland L.W., Russell A.S., Emery P., Abud- Mendoza C., et al. (2008). Results of a two year follow-up study of patients with rheumatoid arthritis who received a combination of abatacept and methotrexate. *Arthritis Rheum*; **58**: 953–63.

Kreofsky T., Schlager J.W., Vuk-pavlovic Z., Abraham R.T., Rohrbach M.S. (1992). Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolarN macrophages. *Am. J. Resir. Cell. Mol. Biol*. **7:** 172 - 181.

Kuria K.A., Chepkwony H., Govaerts C., Roets E., Busson R., De Witte P., Zupko, I., (2002). The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga remota*. Journal of Natural Products **65:** 789–793.

Kuria K.A., De Coster S., Muriuki G., Masengo W., Kibwage I., Hoogmartens J., Laekeman G.M. (2001). Antimalarial activity of *Ajuga remota* Benth (Labiatae) and *Caesalpinia volkensii* Harms (Caesalpiniaceae): in vitro confirmation of ethnopharmacological use. Journal of Ethnopharmacology **74:** 141–148.

Kuria K.A., Muriuki G. (1984). A new cardiotonic agent from *Ajuga remota* Benth (Labiatae). East African Medical Journal **61:** 533– 538.

Landewé R.B., Boers M., Verhoeven A.C., Westhovens R., van de Laar M.A., Markusse H.M., et al. (2002). COBRA combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: long term structural benefits of a brief intervention. *Arthritis rheum*;**46**:347–56.

Lard L.R., van Gaalen F.A., Schonkeren J.J., Pieterman E.J., Stoeken G., Vos K., et al. (2003). Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*;**48**:1841–1848.

Lars-Olof H., Current H. (1997). Qualitative determination of C-reactive protein (CRP) *Opinion in infection diseases* **10:** 196-201.

Larsson E., Erlandsson Harris H., Lorentzen J. C., Larsson1 A., Mansson B., Klareskog L., Saxne T. (2002) Serum concentrations of cartilage oligomericmatrix protein, fibrinogen and hyaluronandistinguish inflammation and cartilage destruction in experimental arthritis in rats *Rheumatology* **2 (41):** 996–1000.

Le Loët X., Lequerré T., Vittecoq O. (2005). Factors predicting responsiveness to anti TNF alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis : using biotherapies rationally. *Joint Bone Spine*;**72**(4):346-7.

Lipsky P.E., van der Heijde D.M., St Clair E.W., Furst D.E., Breedveld F.C., Kalden J.R., et al. (2000). Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*;**343**:1594–1602.

Lu J., Kasama T., Kobayashi K., Yoda Y., Shiozawa F., Hanyuda M., Negishi M., Ide, H., Adachi M. (2000). Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* **164(11),** 5922-5927.

Lu, E.C.(1992) Toxicologie (traduit de l'anglais par Lhuguenot JC et Riviere JL). Masson, paris.

lvarez L., Gil A.G., Ezpeleta O., Jalon-Garcia, J.A., Cerain, L.(2004). Immunotoxic effects of OchratoxinAinWistar rats after oral administration. Food and Chemical Toxicology; **42:** 825–834.

Marcelletti, J.F., Nakamura, R.M. (2003). Assessment of serological markers associated with rheumatoid arthritis. Diagnostic autoantibodies and conventional disease activitymarkers, Clin. Appl. Immunol.Rev; **4:** 109–123.

Markham, K.R. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London. 1982.

Matsumoto I., Staub A., Benoist C., Mathis D. (1999). Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*; **286**:1732–1735.

May M.J., Ghosh S. (1999). Signal transduction through NF-KB. *Immunol Today*; **19**:80–88.

Mazières B., Contagrel A., Constantin A. (1999). La polyarthrite rhumatoïde. *Guide pratique de rhumatologue* 307-327.

Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52:** 673-751.

Miller L.C., Tainter M.L.(1944). Estimation of the ED50 and its error by means of logarithmic probit graph paper. In: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. **57:** 261–264.

Milovanovic, M., Nilsson, E., Jaremo, P. (2004). Relationships between platelets and inflammatory markers in rheumatoid arthritis.ClinChimActa; **343**: 237–40.

Miotla J., Maciewicz R., Kendrew J., Feldmann M., Paleolog E. (2000). Treatment with soluble VEGF receptor reduces disease severity in murine collagen-induced arthritis. *Lab Invest* **80(8):** 1195-1205.

Miyazawa K., Mori A., Miyata H., Akahane M., Ajisawa Y., Okudaira H. (1998). Regulation of interleukin-1beta-induced interleukin-6 gene expression in human fibroblast-like synoviocytes by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*; **273**:24832–24838.

Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathology and pharmacology. *Pharmacol. Rev*. **43**:109–142.

Morel J., Miossec P., Combe B. (2004). Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde *EMC-Rhumatologie Orthopédie* ; **1 :** 218–230

Morel J.C., Park C.C., Woods J.M., Koch A.E. (2001). A novel role for interleukin-18 in adhesion molecule induction through NF kappa B and phosphatidylinositol (PI) 3-kinase-dependent signal transduction pathways. *J Biol Chem*;**276**: 37069–37075.

Mottonen T., Hannonen P., Korpela M. et al. (2002). Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combinaison disease modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*;**46** :894-8.

Mukinda J.T., Syce J.A., (2007). Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* **112:** 138–144.

Mur E., Hartig F., Eibl G., et al. (2002). Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloidchemotype of uncaria tomentosa for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **29(4):**656.

Mythilypriya R., Shanthi P., Sachdanandam P. (2008). Therapeutic effect of Kalpaamruthaa, a herbal preparation on adjuvant induced arthritis in Wistar rats, *Inflammopharmacology***16:** 21–35.

Naik S.R., Filho J.M.B., Dhuley J.N., Deshmukh A.(1991). Probable mechanism of hypoglyceamic activity of bassic acid, a natural product isolated from *Bumelia sartorum*. *Journal of Ethnopharmacology* **33:** 37–44.

Nieto A., Caliz R., Pascual M., Mataran L., Garcia S., Martin J. (2000). Involvement of Fcgamma receptor IIIA genotypes in susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; **43**:735–739.

Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K. and van Leeuwen P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **74:** 418-425.

O'Dell J.R. (2007). The best way to treat early rheumatoid arthritis? *Ann Intern Med*;**146**: 459–60.

Obatomi, D.K., Bikomo, E.O., Temple, V.J.(1994). Antidiabetic properties of the African Mistletoe in streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology **43:** 13–17.

Odek-Ogunde, M., Rajab, M.S., Migwi, G.J., Ndegwa, J.M. (1993). Blood pressure responses to an extract of *Ajuga remota* in experimentally hypertensive rats. Planta Medica **59:** 573–574.

Ohshima S., et al. (1998).Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95:** 8222-8226.

Okada Y., Morodomi T., Enghild J.J., Suzuki K., Yasui A., Nakanishi I., et al. (1990) Matrix metalloproteinase 2 from human rheumatoid synovial fibroblasts. Purification and activation of the precursor and enzymic properties. *Eur J Biochem*;**194**: 721–730.

Okumura N., Haneishi A., Terasawa F. (2009). Citrullinated fibrinogen shows defects in FPA and FPB release and fibrin polymerization catalyzed by thrombin. *Clin Chim Acta*; **401:** 119-23.

OLLIER C. (2000). *Conseil en phytothérapie*, Pro-officina, éditions Groupe liaisons SA, Rueil Malmaison,

Olsen N.J., Stein C.M. (2004). New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*; **350:** 2167-2179.

Oppenheimer-Marks N., Davis L.S., Bogue D.T., Ramberg J., Lipsky P.E. (1991). Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol*;**147**: 2913–2921.

Page G., Lebecque S., Miossec P. (2002). Anatomic localization of immature and mature dendritic cells in an ectopic lymphoid organ: correlation with selective chemokine expression in rheumatoid synovium. *J Immunol*; **168**: 5333–5341.

Palmeiro N.M.S., Almeida C.E., Ghedini P.C., Goulart L.S., Pereira M.C.F., Huber S., Silva J.E.P., Lopes S.(2003). Oral subchronic toxicity of aqueous crude extract of *Plantago australis* leaves. Journal of Ethnopharmacology **88:** 15–18.

Panayi G.S., Corrigall V.M., Pitzalis C. (2001) Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other beasts. *Rheum Dis Clin North Am*;**27**: 317–334.

Pap T., Franz J.K., Hummel K.M., Jeisy E., Gay R., Gay S. (2000). Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction. *Arthritis Res*;**2**: 59–64.

Pascual-Villalobos M.J., Robledo A. (1998). Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. *Industrial Crops and Products* **8**: 183–194.

Pearson C.M., Wood F.D. (1959) Studies of polyarthritis and other lesions induced in rats given adjuvants, Arthritis Rheum. **2**: 440–459.

Petterino C., Argentino-Storino A. (2006). Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague–Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Experimental and Toxicologic Pathology* **57**: 213–219.

Pettit A.R., Ji H., von Stechow D., Muller R., Goldring S.R., Choi Y., et al. (2001). TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol*;**159**: 1689–1699.

Pettit A.R., Thomas R. (1999). Dendritic cells: the driving force behind autoimmunity in rheumatoid arthritis? *Immunol Cell Biol*;**77:** 420–427.

Peungvicha P., Thirawarapan S.S., Temsiririrkkul R., Watanabe H., Prasain J.K., Kadota S. (1998). Hypoglycaemic effect of the water extract of *Piper sarmentosum* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* **60:** 27–32.

Pietta P.G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63:** 1035-1042.

Pinet V., Combe B., Avinens O., Caillat-Zucman S., Sany J., Clot J., et al. (1997) Polymorphism of the HLA-DMA and DMB genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*;**40**: 854–858.

Pittler M.H., Ernst E. (2003). Systematic review: hepatotoxic events associated with herbal medicinal products. Alimentary Pharmacology and Therapeutics **18:** 451–471.

Pope R.M. (2002). Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*; **2**:527–535.

Potapovich A.I., Kostyuk V.A. (2003). Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. *Biochemistry (Moscow)* **68**: 514-519.

Pratt A.G., Isaacs J.D., Mattey D.L. (2009). Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Cl Rh*;**23**: 37-48.

Price M.P., Butler L.G. (1977). Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. Journal of Agricultural and food chemistry **25**: 1268–1273.

Raissouni N., Gossec L., Ayral X., Dougados M. (2005). Quelles nouveautés dans le diagnostic et le traitement d'une PR récente. *Rev Rhum*;**72**: 195-200.

Rajendran M., Palanivelu S., Panchanadam S. (2008). Salubrious effect of Kalpaamruthaa, a modified indigenous preparation in adjuvant-induced arthritis in rats-A biochemical approach Chemico-Biological Interactions **173:** 148–158.

Rajendran M., Palanivelu S., Panchanadam S. (2008). Salubrious effect of Kalpaamruthaa, a modified indigenous preparation in adjuvant-induced arthritis in rats—A biochemical approach Chemico-Biological Interactions **173:** 148–158.

Raza M., Al-Shabanah O.A., El-Hadiyah T.M., Al-Majed A.A.(2002). Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica* **70:** 135–145.

Redlich K., Hayer S., Maier A., Dunstan C.R., Tohidast-Akrad M., Lang S., et al. (2002). Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum*;**46**: 785–792.

Res P.C., Schaar C.G,. Breedveld F.C., van Eden W., van Embden J.D., Cohen I.R., et al., (1988) Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis, *Lancet* **2 (8609):** 478–480.

Reveillard J.P. (2001). Immunologie. 4ème édition. *Ed: Boeck*. Pp: 229.

Ricklin D., Lambris J.D. (2007). Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol* **25**: 1265-1275.

Rivera A., Chen C.C., Ron N., Dougherty J.P., Ron Y. (2001). Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revised antigen-specific B cells are essential for cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentration. *Int Immmunol*; **13**: 1583-93.

Rosloniec F., Cremer M., Kang A., Myers L.K. (1994) Animal models for autoimmune and inflammatory disease: collagen-induced arthritis. Colagin, J.E. (Ed.), Current protocols in immunology. John Wiley, New York,; **15:** 1–25.

Roux S., Orcel P. (2000). Bone loss. Factors that regulate osteoclast differentiation: an update. *Arthritis Res*;**2**: 451–456.

Roymans D., Slegers H. Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem* 2001; **268**: 487–498.

Sailer E.R., Schweizer S., Boden S.E., et al. (1998).Characterization of an acetyl-11-keto-beta-boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. *Eur J Biochem* **256(2):** 364.

Salliot C., Dougados M., Gossec L. (2009). Risk of serious infections during rituximab, abatacept and anakinra treatments for rheumatoid arthritis: meta-analyses of randomised placebo-controlled trial. *Ann rheum Dis*;**68**: 25–32.

Sany J. (2003).Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte: conception actuelle. *Ed: John Libbey Eurotext. Montrouge*. Pp: 6-100-113-178-298.

Sany J., Combe B., Jorgensen C. (1997). Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte (I). Aspects cliniques. *Encycl Méd Chir* (Elsevier SAS, Paris). *Appareil locomoteur* 14-220-A-10.

Saraux A., Berthelot JM., Chales G., Le Henaff C., Thorel JB., Hoang S. (2001). Ability of the American College of Rheumatology 1987 criteria to predict rheumatoid arthritis in patients with early arthritis and classification of these patients two years later. ArthritisRheum**44:**2485-91.

Satoh M., Treadwell E.L., Reeves W.H. (1995). Pristane induces high titers of anti-Su and antinRNP/ Sm autoantibodies in BALB/c mice. Quantitation by antigen capture ELISAs based on monospecific human autoimmune sera. *J Immunol Methods* **182**: 51-62 .

Schiff M.H. (2005). Lack of response to anakinra in rheumatoid arthritis following failure of tumor necrosis factor alpha blockade. *Arthritis Rheum*; **52**:364–5.

Sebbag M., Chapuy-Regaud S., Auger I., Petit-Texeira E., Clavel C., Nogueira L., et al. (2004). Intérêt clinique et rôle physiopathologique de la réponse auto-immune contre les protéines citrullinées dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum*;**71** :872-82.

Shimizu Y., Newman W., Tanaka Y., Shaw S. (1992). Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today*; **13**:106–112.

Silman A., Kay A., Brennan P. (1992). Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*;**35**:152–155.

Silman A.J., Newman J., MacGregor A.J. (1996). Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins. *Arthritis Rheum*;**39**: 732–735.

Simmonds M.S.J., Blaney W.M. (1992). Labiate-insect interactions: effects of labiates derived compounds on insect behaviour. *In* "Harley, R.M., Reynolds, T. (Eds.), Advances in Labiatae Science", *Royal Botanic Gardens*, Kew. pp: 375-392.

Smeets T.J., Kraan M.C., van Loon M.E., Tak P.P. (2003). Tumor necrosis factor alpha blockade reduces the synovial cell infiltrate early after initiation of treatment, but apparently not by induction of apoptosis in synovial tissue. *Arthritis Rheum*;**48**:2155–2162.

Smitten A., Simon T., Qi K. (2008). Hospitalised infections in the abatacept RA epidemiological development program: an updated epidemiological assessment with > 10,000 persons/years of exposure. *Arthritis Rheum*;**58** (9): 786–7.

Smolen J.S., Beaulieu A., Rubbert-Roth A., Ramos-Remus C., Rovensky J., Alecock E., et al. (2008). Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-mind, placebo-controlled, randomized trial. *Lancet*;**371**: 987–97.

Smolen J.S., Steiner G. (2003).Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. Nat Rev Drug Discov**2,** 473–88.

Sone, H., Sakauchi, M., Takahashi, A., Suzuki, H., Inoue, N., Iida, K., Shimano, H., Toyoshima, H., Kawakami, Y., Okuda, Y., Matsuo, K., Yamada, N. (2001). Elevated levels of vascular endothelial growth factor in the sera of patients with rheumatoid arthritis correlation with disease activity. *Life Sci* **69 (16):** 1861-9.

Srivastava K.C., Bordia A., Verma S.K (1995). Curcumin a major component of food spice turmeric (Curcuma longa) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **52(**4):223.

St Clair E.W., van der Heijde D.M., Smolen J.S., Maini R.N., Bathon J.M., Emery P., et al. (2004). Combination of infliximab and methotrexate therapy for early rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Rheum*;**50**: 3432–43.

Stevens, K.R., Mylecraine, L.(1994). Issues in chronic toxicology. In: Hayes, A.W. (Ed.), Principles and Methods of Toxicology, *3rd ed. Raven Press, New York,* p. 673.

Stoerk H.C., Bielinski T.C., Budzilovich T. (1954) Chronic polyarthritis in rats injected with spleen in adjuvants, *Am. J. Pathol*. **30**: 616–621.

Stuart M., Cremer M.A., Townes A.S., Kang A.H. (1982).Type II collagen-induced arthritis in rats. Passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis, *J. Exp. Med*. **155** (1): 1–16.

Suzuki M., Tetsuka T., Yoshida S., Watanabe N., Kobayashi M., Matsui N., et al. (2000). The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL-1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett*; **465**:23–27.

Svensson B., Boonen A., Albertsson K., Van der Heijde D., Hafström I. (2005). Low dose prednisolone in addition for the initial disease modifying antirheumatic drug in patients with early active Rheumatoid arthritis reduces joint destruction and increases the remission rate. *Arthritis Rheum*;**52**: 3360–70.

Szekanecz Z, Koch AE. (2009). Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis, *Vasc Pharm* doi:10.1016/j.vph.2009.02.002.

Takayanagi H., Iizuka H., Juji T., Nakagawa T., Yamamoto A., Miyazaki T., et al. (2000). Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/ osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthriris Rheum*;**43**: 259–269.

Talalay P. (2001). The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. Academic Medicine **76:** 238–247.

Teo S., Stirling D., Thomas S., Hoberman A., Kiorpes A., Khetani V. (2002). A 90 day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. Toxicology **179:** 183–196.

Terato K., D.S. Harper, M.M. Griffiths, D.L. Hasty, X.J. Ye, M.A. Cremer, et al., (1995). Collagen-induced arthritis in mice: synergistic effect of *E. coli* lipopolysaccharide bypasses epitope specificity in the induction of arthritis with monoclonal antibodies to type II collagen, *Autoimmunity;* **22** (3): 137–147.

Thomas T., Noël E., Goupille P. (2006). The rheumatoid shoulder : current consensus on diagnosis and treatement. *Joint Bone Spine*;**73** (2):139-43.

Tighe H., Chen P.P., Tucker R., Kipps T.J., Roudier J., Jirik F.R., et al. (1993). Function of B cells expressing a human immunoglobulin M rheumatoid factor autoantibody in transgenic mice. *J Exp Med*;**177**: 109–118.

Tran C.N., Lundy S., Fox D.A. (2005).Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathol Physiol*;**12**: 183-9.

Trentham D.E., Townes A.S., and Kang A.H. (1977). Autoimmunity to type II collagen: An experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* **146:** 857-868.

Trollmo C., Nilsson I.M., Sollerman C., Tarkowski A. (1996). Expression of the mucosal lymphocyte integrin alpha E beta 7 and its ligand E-cadherin in the synovium of patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*;**44**: 293–298.

Udalova IA, Richardson A, Ackerman H, Wordsworth P, Kwiatkowski D. (2002**).** Association of accelerated erosive rheumatoid arthritis with a polymorphism that alters NF-kappaB binding to the TNF promoter region. *Rheumatology* **41**:830–831.

Umar S., Zargan J., Ahmad S., Katiyar C.K., Khan H.A. (2012), Modulation of the oxidative stress and inflammatory cytokine response by thymoquinone in the collagen induced arthritis in Wistar rats, Chemico-Biological Interactions doi: 10.1016/j.cbi.2012.03.003

Van Boekel M.A., Vossenaar E.R., van den Hoogen F.H., van Venrooij W.J. (2002). Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res*; **4**: 87–93.

Van de Loo F.A., Kuiper S., Van Enckevort F.H., Arntz O.J., Van den Berg, W.B. (1997). Interleukin-6 reduces cartilage destruction during experimental arthritis. A study in interleukin-6-deficient mice. *Am J Pathol* **151**: 177-191.

Van der Heijde D., Klareskog L., Rodriguez-Valverde V., Codreanu C., Bolosiu H., Melo-Gomes J., et al. (2006). Comparison of etanercept and methotrexate alone and combined, in the treatment of rheumatoid arthritis: two years clinical and radiographic results from the TEMPO study, a double-mind, randomized trial. *Arthritis Rheum*; **54**:1063–74.

Van Gaelen F., Visser H., Huizinga TW. (2005). A comparison of the diagnostic accuracy and pronostic value of the first and second anti-cyclocitrullinated peptides autoantibody (CCP1 and CCP2) test for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*; **64**:1510-1512.

Verstappen S.M., Jacobs J.W., van der Veen M.J., Heurkens A.H., Schenk Y., ter Borg E.J., et al. (2007). Intensive treatment with methotrexate in early rheumatoid arthritis: aiming for remission. Computer Assisted Management in Early Rheumatoid arthritis (CAMERA, an open-label strategy trial). *Ann Rheum Dis*; **66**: 1443–9.

Weinblatt M., Combe B., Covucci A., Aranda R., Becker J.C., Keystone E., et al. (2006). Safety of the selective costimulation modulator abatacept in rheumatoid arthritis patients receiving background biologic and nonbiologic disease-modifying antirheumatic drugs: an one year randomized, placebocontrolled study. *Arthritis Rheum*; **54**: 2807–16.

Wendling D., Jorgensen C. (2002). Traitement de la polyarthrite rhumatoïde par l'antagoniste du récepteur de l'interleukine 1. *Rev Med Interne*;**23**: 1006-1011.

Wendling D., Streit G., Toussirot E., Prati C. (2008). Herpes zoster in patients taking TNF-alpha antagonists for chronic inflammatory joint disease. *Joint Bone Spine;* **75**: 540–3.

Wessner M., Champion B., Girault J.P., Kaouadji N., Saidi B.,Lafont R. (1992). Ecdysteroids from *Ajugaiva.Phytochemistry-Oxford* **31**: 3785-3788.

Weyand C.M., MacCarthy T.G., Goronzy J.J. (1995). Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*; **95**: 2120–2126.

Weyand, C.M., Goronzy, J.J., Takemura, S., Kurtin, P.J. (2000) Cell–cell interactions in synovitis. Interactions between T cells and B cells in rheumatoid arthritis. Arthritis Res. **2:** 457–63.

Wilder R.L., Allen J.B., (1985). Regulation of susceptibility to bacterial cell wall-induced arthritis in rats, *Arthritis Rheum*. **28 (11):** 1318–1319.

Wilder, R.L. (1988) Streptococcal cell-wall-induced arthritis in rats: an overview, *Int. J. Tissue React.* **10 (1**): 1–5.

Wilder, R.L.(1998) Streptococcal Cell Wall Arthritis. *Current Protocolsin Immunology*, **3**: 1–12.

Williams R.O. (1998). Rodent models of arthritis: relevance for human disease. *Clin Exp Immunol* **114**: 330-332.

Witthawaskul P., Panthong A., Kanjanapothi D., Taesothikul T., Lertprasertsuke N., (2003). Acute and subacute toxicities of saponin mixture isolated from *Scheffera leucantha Viguier. Journal of Ethnopharmacology* **89:** 115–121.

Wong P.K., Campbell I.K., Egan P.J., Ernst M., Wicks I.P. (2003). The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover. *Arthritis Rheum*; **48**: 1177–1189.

Wooley P.H. (1991) Animal models of rheumatoid arthritis, *Curr. Opin. Rheumatol;* **3:** 407–420.

Wooley P.H. (2004) The usefulness and the limitations of animal models in identifying targets for therapy in arthritis, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol*. **18** (1): 47–58.

Wooley P.H., Chapedelaine J.M. (1987). Immunogenetics of collagen-induced arthritis. *Crit Rev Immunol;* **8**: 1-22.

Yun T.K (2003). Experimental and epidemiological evidence on non-organ specific cancer preventive effect of Korean ginseng and identification of active compounds. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 523/524, 63-74.

Yun H. J., Yoo W. H., Han M. K., Lee Y. R., Kim J. S., Lee S. I. (2008). Epigallocatechin-3-gallate suppresses TNF-alpha -induced production of MMP-1 and -3 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatol Int*. *29(1)*. Pp: 23-29.

Zhang, X., Rimpilainen, M., Simelyte, E., Toivanen, P. (2001) Characterisation of Eubacterium cell wall: peptidoglycan structure determines arthritogenicity, *Ann. Rheum. Dis.* **60 (3):** 269–274.

Zhu J.X., Wang Y., Kong L.D., Yang C., Zhang X. (2004). Effects of *Biotaorientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxone induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology* **93:** 133.

Zimmer A.R., Leonardi B., Mirona D., Schapovala E., Rodrigues de Oliveirac J., Gosmanna G, (2012) Antioxidant and anti-inflammatory properties of Capsicum baccatum: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology* **139 :** 228– 233.

Pharmacognosy Communications
Volume 3 | Issue 2 | Apr–Jun 2013
www.phcogcommn.org

Research Article

Preventive and curative effect of the methanolic extract of *Ajuga iva* on collagen induced arthritis in rats

Arrar Lekhmici[1]*, Diafet Abdelwahab[2], Charef Noureddine[1], Khennouf Seddik[3], and Baghiani Abderrahmane[1]

[1]*Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Nature and Life Science, University Ferhat Abbas, Setif, Algeria*
[2]*Department of Biology, University Bachir El Ibrahimi, Bordj Bou Arreridj, Algeria*
[3]*Laboratory of Phytotherapy applied to Chronic diseases, Faculty of Nature and Life Science, University Ferhat Abbas, Setif, Algeria*

ABSTRACT: **Introduction:** The medicinal plants are widely used around the world. Rheumatoid arthritis (RA) affects 1% of the adult population, and has a significant impact on physical functioning and social life. In rats, induction of arthritis by collagen II causes alterations of synovial joints similar to patients with RA. In this study the collagen induced arthritis model was used to evaluate the anti-arthritic effect of *Ajuga iva* extract. **Materials and Methods:** Arthritis was induced by collagen emulsified with complete Freund's adjuvant. Arthritic rats were treated orally with the methanolic extract of *Ajuga iva*. To study the preventive effect, 30 and 60 mg/kg of body weight, were daily administrated during the first 21 days. For the curative effect, 100 and 150 mg/kg of body weight were daily administrated during 21 days starting from the appearance of arthritis signs. Changes in body weight, swelling of legs, level of protein C, sedimentation rate, and the histopathological status of articulation were evaluated as markers of inflammation associated with arthritis. **Results:** In the preventive treatment of rats, the methanolic extract of *A. Iva* inhibited significantly the markers of inflammation and arthritis. *Ajuga iva* extract, in the curative treatment study, reduced significantly the swelling of legs and other parameters of inflammation such as C reactive protein (CRP) level, erythrocyte sedimentation rate (ESR) and leukocytes. Histopathological examination showed reduced erosion and destruction of bone. **Conclusion:** Our results show that the methanolic extract of *A. iva* plays an effective role in the prevention and treatment of collagen induced arthritis. The way by which the components contained in this extract act to prevent or to reduce the inflammation is not clear but it may be due to their inhibition of the pro-inflammatory cytokines.

KEYWORDS: *Ajuga iva*, methanolic extracts, collagen induced arthritis, anti-arthritic effects, joint inflammation

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by the chronic and systemic inflammatory of the synovial membranes, and by the progressive and erosive destruction of cartilage and bone.[1] RA affects 1% of the adult population, and has a significant impact on physical and social activities of patients.[2] The etiology and the pathogenicity of RA are not entirely known, but an autoimmune attack on the membranes probably has a crucial role.[3] The majority of the drugs currently used in the treatment of RA have several side effects and toxicities which prevent their long-term use. Corticoids used to treat RA can reduce the synovitis in the short term, but in long-term cause damage to the synovial membrane.[4] Unfortunately, they have several side effects, such as infections, osteoporosis,[5] insulin resistance and diabetes,[6] significant teratogenic effects.[7] Moreover, they could increase the risk of cardiovascular disease in RA patients due to their potential noxious properties on the lipids, and the development of hypertension with/without obesity.[8] Consequently, it is necessary to develop preventive treatments and therapeutic agents without harmful effects on the RA patients. This growing interest of the alternative medical practices clearly indicates the need to investigate their safety and effectiveness.[9] Medicinal plants were largely used in traditional medicine to treat rheumatoid arthritis.

Ajuga iva L. (AI) Schreber (locally called Chendgoura), has been shown to display a wide spectrum of biological and pharmacological activities, which provide experimental

*Correspondence
PrLekhmici Arrar
E-mail: emaillekharrar@hotmail.com
DOI: 10.5530/pc.2013.2.5

© Copyright 2013 EManuscript Publishing Services, India

support for the empiric ethnopharmacological use of this plant in folk medicine. It has numerous beneficial effects such as panacea (cure-all),[10] gastrointestinal disorders,[11] hypertension, diabetes,[12] anthelmintic and antiinflammatory.[13] The plants of the genus *Ajuga* have been reported to have antifungal, antibacterial,[14–15] antimycobacterial,[16] antihypertensive,[17] antiplasmodial,[18] hypoglycaemic,[19] larvae and insect antifeedant activitis.[13,20–21] Nevertheless, antiarthritic activities for *Ajuga iva* have never been proved. Thus, we considered it interesting to investigate whether there is a scientific basis for the Algerian traditional use of this plant as an anti-rheumaismal drug. In the present study, we evaluated the anti-arthritic effect of the methanolic extract of *Ajuga iva* on collagen induced rheumatoid arthritis using a model of the rats which is an animal model of human rheumatoid arthritis.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Ajuga iva (L.) Schreber was collected from Bordj Bou Arreridj, in the northeast of Algeria in June 2010, and identified by Pr. Laouar H (Department of Ecology and Vegetal Biology, University Ferhat Abbas, Setif). A voucher specimen was deposited at the Laboratory of Botany, Department of Vegetal Biology and Ecology, Faculty of Nature and Life Sciences. All reagents were purchased from Sigma Chemicals (Germany), Fluka and Prolabo.

Extraction procedure

The extraction of polyphenols was carried out according to the method described earlier[22] with slight modifications. Dried plant material was ground in warring blender, mixed with a 10–20 volume of 85% aqueous methanol. The slurry was placed at room temperature for one week and the extract was filtered through a Buchner funnel and the methanol was removed by rotary evaporation. The dried extract was stored at –20°C temperature until use.

Animals

Male and female Wistar rats weighting 150–200 g (7–8 weeks old) were purchased from (Institut Pasteur d'Algérie, Algiers). The animals were treated under ethical conditions according to international recommendations. Rats were acclimated one week to eliminate the effect of stress prior to initiation of the experiments. They were housed five per cage in rooms maintained at 22–24°C with alternating 12 h light/dark cycle. Food and water were provided *ad libitum* throughout the experiments.

Induction of Rheumatoid Arthritis methanolic extract treatment

Rheumatoid arthritis was induced in male and female Wistar rats using the method described by Rosloniec *et al.*[23] and Charles-Schoeman *et al.*[24] Briefly, rats were intradermally injected at the base of the tail with 300 µg of chicken type II collagen (CII) dissolved in acetic acid 0.1M, emulsified in a same volume of complete Freund's adjuvant. On day 7 all rats were boostered by injecting a further 200 µg of CII in incomplete Freund's adjuvant. The same volume of acetic acid was injected to the rats in the normal control group. A total of 60 rats were randomized into six groups of 10 rats: (G1) normal control (NCG), (G2) collagen-induced arthritis positive control (PCG), (G3, G4) *Ajuga iva* preventive treated and (G5, G6) *Ajuga iva* curative treated groups, respectively. In the preventive protocol, the treatment has began at the day of arthritis induction (day 0). CIA rats were treated daily with oral administration of different doses of AILE (30, and 60 mg/kg body weight), until day 21. In the curative treatment protocol for the established CIA, treatment with AILE, was initiated on the day of installation of arthritis (day 14) and continued daily until day 40. CIA rats were treated with oral administration of different doses of AILE, 100 or 150 g/kg of body weight.

Evaluation of arthritis development

Rats were inspected daily for the onset of arthritis characterized by edema and/or erythema in the paws. The incidence and severity of arthritis were evaluated using a system of arthritic scoring, measurement of bi-hind paw volumes and body weight every 2 or 3 days beginning on the day where arthritic signs were first visible. Lesions of the four paws of each rat (i.e., the clinical arthritic signs) were graded from 0 to 4; where, 0 = no evidence of edema and swelling; 1 = slight swelling and erythema limited to foot or ankle joint; 2 = slight edema and erythema from the ankle to the midfoot (tarsal); 3 = moderate swelling and erythema extending from the ankle to the metatarsal joints; 4 = severe swelling and erythema encompassing the ankle, foot, and digits. The score 16 is the potential maximum of the combined arthritic scores per animal for an individual scoring the highest grades for all tests.[23]

Leukocyte counts

Peripheral blood samples were collected on day 14 and 21 for control and preventive groups and on days 14, 21, and 40 for the curative group. Blood was collected into EDTA containing tubes (Diagnostics Pasteur, France). Leucocytes were counted automatically with a blood cell counter (Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg, Germany).

Histopathological analysis

The hind paws were fixed in 10% formalin for 7 days, decalcified in formic acid (15%), washed with running tap water for 3 h and dehydrated in a graded series of ethanol and xylene, then embedded in paraffin. Thin sections (4 µm) were stained with haematoxylin–eosin and studied under the light microscope. Infiltration of inflammatory cells and connective tissue hyperplasia were monitored.

Measurements of ESR and CRP levels

Blood samples were collected by retro-orbital venipuncture of animals on days 14, 21, and 40, and erythrocyte sedimentation rate (ESR) was determined by a modified method based on International Council for Standardization in Haematology (ICSH) selected methods.[25] Briefly, 120 µl of blood sample were taken in 1.0 mm × 100 mm capillary tube, and the rates of erythrocyte sedimentation were recorded after 60 and 120 min. Levels of CRP in serum were measured on days 14, 21 and 40 using commercially available kits for CRP (SPINREACT, S,A Giroma, Spain), according to the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

The data on clinical scores were analyzed with the Student *t* test and are presented as the mean ± SD. Difference between controls and treated groups was considered significant at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Effect of AIME on clinical signs

The rats were immunized at the base of the tail with collagen type II (CII). The inflammation started to develop after the twelveth day of the first immunization of non treated rats. The methanolic extract of *Ajuga iva* and distilled water were orally administrated to the rats each day during three weeks. For the preventive groups, the administration was carried out since the first day of the immunization, whereas, for the curative groups, the treatment began after the appearance of the signs of arthritis (day 14 until day 40). Results are shown in Figure 1. Up to 90% of the immunized animals by collagen II (the positive reference group) showed signs of arthritis; swellings and redness of the legs, after 14 days. The preventive treatment using either 30 or 60 mg/kg of body weight delayed the appearance of the clinical signs of arthritis and reduced clearly the severity of the disease (Figure 1a). Equally, the curative use of the *Ajuga iva* methanolic extract (AIME) at the doses of 100 or 150 mg/kg of the body weight, reduced remarkably the severity of the swelling and the erythema ($p < 0.001$) (Figure 1b).

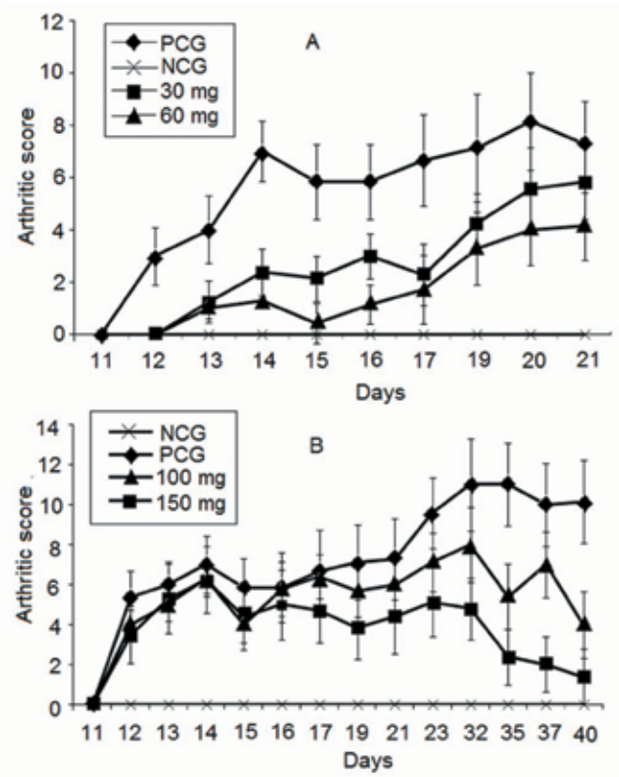


Figure 1. The development of the clinical signs (arthritic score) in rats A) preventive groups treated with 30 and 60 mg of AIME/kg of rat body weight, B) curative groups treated with 100 and 150 mg of AIME/kg of rat body weight (PCG: positive control group, NCG: negative control group).

Effect of AIME on the body weight

In collagen-induced arthritis control group (PCG), the rats gradually lost their body weight after 14 days of the first immunization $p < 0.01$, in comparison with the negative control group. The extract *of Ajuga iva* leaves did not affected the body weight (Figure 2), although it effectively improved other clinical signs of arthritis such as swelling of the paws and erythema.

Effect of the AIME on the serologic parameters

Samples of the blood from the preventive and curative treated groups were taken in dry tubes. Protein C was detected using specific antibodies. The rats of the positive group showed a high level of the protein C in their serum compared to the negative group (Figure 3). AIME at doses of 100 and 150 mg/kg of body weight reduced significantly ($p < 0.05$) the rate of the protein C in the serum after 21 days, whereas, no changes were observed in the preventive groups.

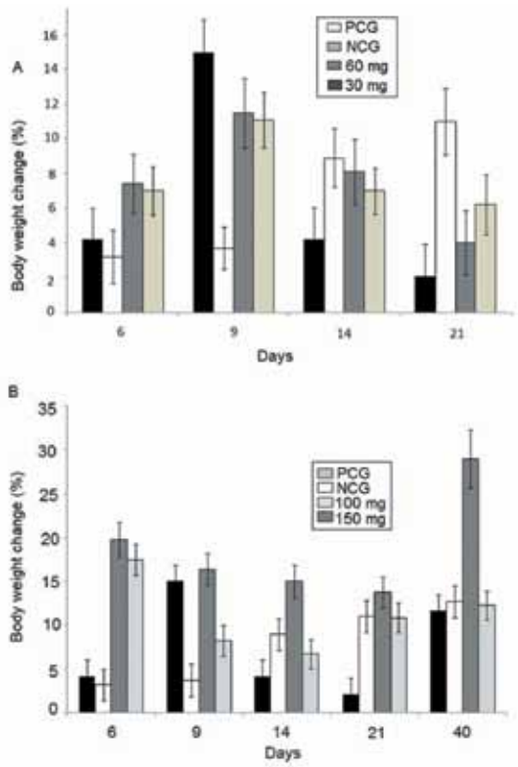


Figure 2. Body weight changes in A) preventive groups treated with 30 and 60 mg of AIME/kg of rat body weight, B) curative groups treated with 100 and 150 mg of AIME/kg of rat body weight (PCG: positive control group, NCG: negative control group).

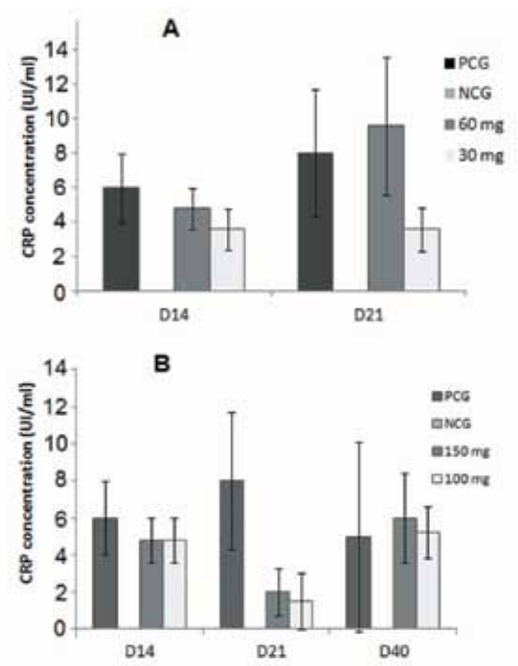


Figure 3. The rate of CRP in the serum, A) in preventive and B) curative groups compared to negative control group (NCG) and positive control group (PCG).

Erythrocyte sedimentation rate and leucocyte count

Inflammation was also reflected on the sedimentation test of the red globules, which increased slightly with the installation of arthritis at the day 14. The rats of the positive control group showed an ESR higher than the negative control group. The extract of AI at 100 and 150 mg/kg reduced the ESR after 21 and 40 days, similar result was obtained in the preventive groups (Figure 4).

After 14, 21 and 40 days of the first immunization the number of the leucocytes was evaluated automatically with a blood cell counter. We noticed a reduction in the numbers of the leucocytes in the treated rats (curative and preventive), compared to the positive control group in the twenty first and the fourtieth days (Figure 5).

AIME effect on the histopathological changes

The joins of arthritic rats presented an infiltration of the granulocytes and mononuclear, which gives a synovial hyperplasia, erosion of cartilage and bone in comparison with the normal group (Figure 6a, b). The extract of *Ajuga iva* showed beneficial effects in these last pathological demonstrations (Figure 6c, d).

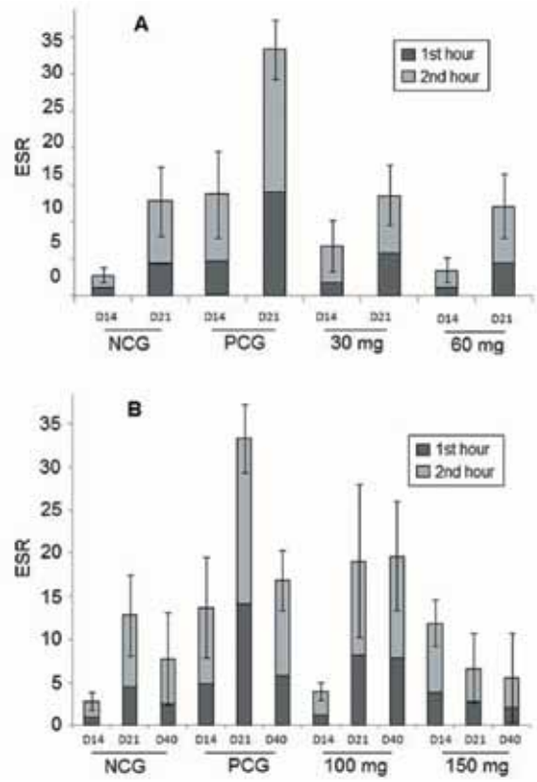


Figure 4. Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR); A) in preventive and B) curative groups compared with negative control group (NCG) and positive control group (PCG).

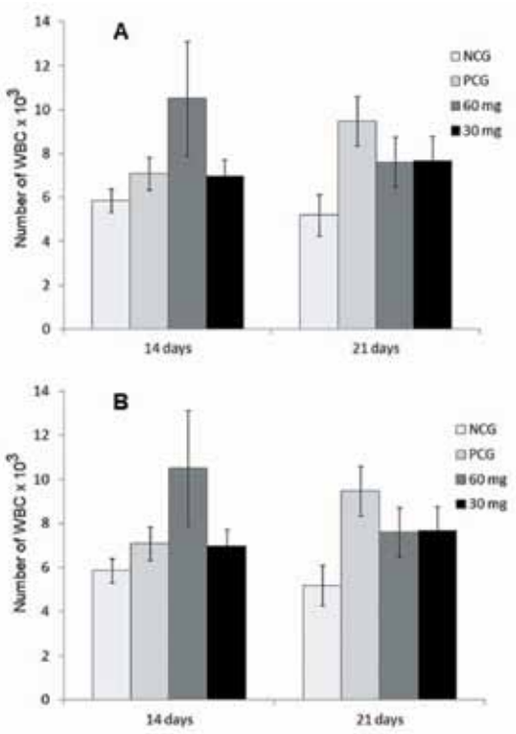


Figure 5. The rate of the white blood cell (WBC); A: preventive and B: curative groups compared to either negative control groupe (NCG) or positive control group (PCG).

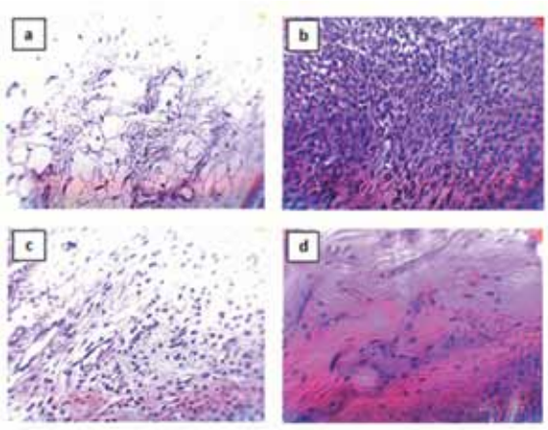


Figure 6. Histological proliferation and infiltration of the leucocytes to the join tissues of rat paw. a: Negative control group, b: positive control group (arthritic), c: curative groups and d: preventive groups.

DISCUSSION

The use of the medicinal plants is the most widespread form of medicine today throughout the world. The recourse to the treatment by the plants as well as the search for new biological active substances presents one of the greatest scientific concerns. So, several studies were conducted to evaluate the biological effects of the medical plants. The present study is devoted to the search for new anti-inflammatory drugs contained in methanolic extract of the air part of *Ajuga iva* using a rheumatoid arthritis model. We noticed that arthritis was induced in 90% of the non treated rats. This result prove the effectiveness of the method used in the induction of the arthritis.[24]

The treatment with the AIME started at the first day of the immunization (day 0) appreciably prevented the beginning of arthritis. The curative treatment starting after the arthritis installation (day 14), removed clearly the progression of the disease. This inhibition seems dose dependent. These effects could be attributed to the flavonoids and polyphenolic contents of AIME which we have previously shown.[26] In fact, the phenolic compounds have been mentioned to exert an anti-inflammatory effect.[27–28]

The variation of the weight of the rats constitutes a significant parameter. Effectively, a difference between the growth of the arthritic and normal rats was noted. The loss of the weight is significantly high in the positive and treated groups compared to the negative group. The legs of arthritic rats swelled and rats moved hardly to reach the food. On the other, hand the loss of the weight at the treated groups could be explained by the hypoglycemiant, hypolipidimiant and/or hypocholesterolemiant effects of *Ajuga iva* extract.[29–30]

The histological study showed a significant development of arthritis by the cell infiltration and the destruction of the cartilage and the bone of the rats of the positive group, and finally a deformation of the joints. Preventive and curative treatment showed a significant reduction of the infiltration of leucocytes in the articular space, which gives a reduction of synovial hyperplasia and, then protects the cartilage and bone.

The C reactive protein is a protein of the acute phase of arthritis. We have observed an increase in the rate of this protein in the positive control group. Similar results were obtained by Mythilypriya *et al.*[31] and Abdin *et al.*[32] Also, Moncada *et al.,*[33] Milovanovic *et al.*[34] and Klimiuk *et al.*[35] have observed high values of CRP indicative of active inflammation in the sera of patients suffering from rheumatoid arthritis. In the preventive group we did not observe any change in the rate of the serum CRP indicating that the methanolic extract of *Ajuga iva* decrease its level. Mythilypriya *et al.*[31] and Bharadwaj *et al.*[36] proposed that CRP can also contribute directly in the pro-inflammatory state, where it stimulates the

release of inflammatory cytokines by the monocytes such as IL-1, IL-6 and TNF α and can also act directly as a pro-inflammatory stimulant of the phagocytic cells to produce the pro-coagulant factor. The pro-inflammatory cytokines help to propagate a local or systemic inflammatory process, to induce the biosynthesis and the secretion of the metalloproteinases (MMPs) and osteoclasts that contribute in the degradation of the extracellular matrix and erosion of bone, respectively.[37–38]. In conclusion, our results indicate that the extract of *Ajuga iva* removed the common inflammatory damage of the rheumatoid arthritis, probably by reducing the production of this protein.

We have observed an increase in ESR in the rats of the positive control group compared to the negative croup. Munro *et al.*[39] also observed a positive correlation between the ESR and arthritis. Analysis of the ESR indicated, a significant difference ($p < 0.05$) between the treated groups and the positive control group. *Ajuga iva* reduced significantly the ESR in the preventive and curative groups.

The increase in the white blood cell (WBC) in rats immunized with standard collagen II confirms the results obtained by Selph *et al.*[40] and Choi *et al.*[41] This increase is due to the stimulation of the immune system against the pathogenic micro-organisms;[42] that is obvious by the infiltration of the inflammatory mononuclear cells in the join.[31]

In the present study we found that the methanolic extract of *Ajuga iva* has an anti-inflammatory effect by the reduction in volume of edema of the legs and the markers inflammatory like CRP, it removed the overproduction of the protein C, the severity of the signs of arthritis (arthritic score), to decrease the number of the leucocytes, the levels of (ESR) were close to that of the negative reference group. However, other studies are necessary to check the effect of the extract of *Ajuga iva* on the other serologic parameters and to assess the possible mode of action of these extracts. Consequently, the administration of the extract of *Ajuga iva* orally can offer an advantage when it is combined with other drugs in the treatment of arthritis.

CONCLUSION

In conclusion, our results indicate that the extract of *Ajuga iva* prevent the common inflammatory damage of the rheumatoid arthritis, probably by reducing the production of this protein.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS), Algeria and by the Algerian Agency for the Development of Research in Health (ANDRS).

REFERENCES

1. Okamoto H, Koizumi K, Kamitsuji S, Inoue E, Hara M, Tomatsu T, et al. Beneficial action of statins in patient with rheumatoid arthritis in a large observational cohort. J. Rheumatol. 2007; 34(5):964–8.
2. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculo skeletal disorders in the United States. Arthritis Rheum.1998; 41(5):778–99
3. Brand D, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. Nat. Protoc. 2007; 2(5):1269–75.
4. Kirwan JR, Bijlsma JW, Boers M, Shea BJ. Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis. Cochrane Database Syst. Rev. 2007; 24(1):CD006356.
5. Ravindran V, Rachapalli S, Choy EH. Safety of medium- to long-term glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Rheumatology (Oxford). 2009; 48(7):807–11
6. Donihi AC, Raval D, Saul M, Korytkowski MT, DeVita MA. "Prevalence and predictors of corticosteroid-related hyperglycemia in hospitalized patients". Endocr. Pract. 2006; 12(4):358–62.
7. Shepard, TH.; Brent, RL.; Friedman, JM.; Jones, KL.; Miller, RK.; Moore, CA.; Polifka, JE. "Update on new developments in the study of human teratogens". Teratology. 2002; 65(4):153–61.
8. Davis JM, Maradit-Kremers MH, Gabriel SE. Use of low dose glucocorticoids and the risk of cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 2005; 32(10):1856–62
9. Callahan LF, Wiley-Exley EK, Mielenz TJ, Brady TJ, Xiao C, Currey SS, et al. Use of complementary and alternative medicine among patients with arthritis. Prev. Chronic Dis. 2009 Apr; 6(2) A44; 3745–7
10. Hassar M. La phytothérapie au Maroc. Espérance Médicale 1999; 47:83–5.
11. Bellakhdar J, Claisse R, Fleurentin J, Younos C. Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. Journal of Ethnopharmacology 1991; 35:123–43.
12. Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. J. Ethnopharmacol. 1997; 58:45–54.
13. Bond`ı ML, Al-Hillo MRY, Lamara K, Ladjel S, Bruno M, Piozzi F, et al. Occurrence of the antifeedant 14,15-dihydroajugapitin in the aerial parts of *Ajuga iva* from Algeria. Biochem. System. Ecology. 2000; 28:1023–5.
14. Chen H, Tan RX, Liu ZL, Zhang Y, Yang L. Antibacterial neoclerodane diterpenoids from *Ajuga lupulina*. J. Nat. Prod. 1996; 59:668–70.
15. Bennaghmouch L, Hajjaji N, Zellou A, Cherrah Y. Pharmacological study of *Ajuga iva*. Ann. Pharm. Fr. 2001. Jul; 59(4); 284.
16. Cantrell CL, Rajab MS, Franzblau SG, Fronczek FR, Fisher NH. Antimycobacterial ergosterol-5,8-endoperoxide from *Ajuga remota*.Planta Medica. 1999; 65:732–4.
17. Odek-Ogunde M, Rajab MS, Migwi GJ, Ndegwa JM. Blood pressure responses to an extract of *Ajuga remota* in experimentally hypertensive rats. Planta. Medica. 1993; 59:573–4.
18. Kuria KA, Chepkwony H, Govaerts C, Roets E, Busson R, De Witte P, et al. The antiplasmodial activity of isolates from *Ajuga remota*. J. Nat. Prod. 2002; 65:789–93.
19. El-Hilaly J, Tahraoui A, Israili ZH, Lyoussi B. Acute hypoglycemic, hypocholesterolemic and hypotriglyceridemic effects of continuous intravenous infusion of a lyophilised aqueous extract of *ajuga iva* l. schreber whole plant in streptozotocin-induced diabetic rats. Pak. J. Pharm. Sci. 2007; 20(4):261–8.
20. Bremner PD, Simmonds MSJ, Blaney WM, Veitch NC. Neo-clerodane diterpenoid insect antifeedants from *Ajuga reptans* ev Catlins Giant. Phytochemistry. 1998; 47:1227–32.
21. Ben Jannet H, Harzallah-Skhiri F, Mighri Z, Simmonds MSJ, Blaney WM. Antifeedant activity of plant extracts and of new diglyceride compounds isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves against Sp*odoptera littoralis* larvae. Industrial Crops and Products. 2001; 14:213–22.

22. Markham KR. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London. 1982
23. Rosloniec F, Cremer M, Kang A, Myers LK. Animal models for autoimmune and inflammatory disease: collagen-induced arthritis. In: Colagin, J.E. (Ed.), Current protocols in immunology. John Wiley, New York, 1994; 15.5 pp. 1–25,
24. Charles-Schoeman C, Banquerigo ML, Hama S, Navab M, Park GS, Van Lenten BJ, et al. Treatment with an apolipoprotein A-1 mimetic peptide in combination with pravastatin inhibits collagen-induced arthritis. Clin. Immunol. 2008 May; 127(2):234–44
25. Bull BS, Caswell M, Ernst E, Kallner A, Koepke JA, Lewis SM, et al. ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. J. Clin. Pathol. 1993 march; 46(3):198–203.
26. Baghiani A, Ameni D, Boumerfeg S, Adjadj M, Djarmouni M, Charef N, Khennouf S[3], Arrar L. Studies of Antioxidants and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of Root and Aerial Parts of Medicinal Plant Capparis Spinosa L. Am. J. Med Medical Sci. 2012; 2(1):25–32
27. Bidet D, Gaignault JC, Girard P, Trotin F. Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: Les flavonoïdes. L'actualité chimique. 1987; 89–97.
28. Kreofsky T, Schlager JW, Vuk-Pavlovic Z, Abraham RT, Rohrbach MS. Condensed tannin promotes the release of arachidonic acid from rabbit resident alveolar macrophages. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1992 Aug; 7(2):172–81.
29. El-Hilaly J and Lyoussi B, 2002. Hypoglycaemic effect of the lyophilised aqueous extract *of Ajuga iva* in normal and streptozotocin diabetic rats. J. Ethno pharmacol. 80: 109–13.
30. El-Hilaly J, Tahraoui A, Israili ZH and Lyoussi B. Hypolipidemic effects of acute and sub-chronic administration of an aqueous extract of *Ajuga iva* L. whole plant in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol*. 2006 May 24; 105(1):441–8.
31. Mythilypriya R, Shanthi P, Sachdanandam P. Therapeutic effect of Kalpaamruthaa, a herbal preparation on adjuvant induced arthritis in Wistar rats. Inflammopharmacology. 2008 Feb; 16(1):21–35.
32. Abdin AA, Abdel-Halim MS, Hedeya SE, El-Saadany AA. Effect of atorvastatin with or without prednisolone on Freund's adjuvant induced-arthritis in rats. Eur. J. Pharmacol. 2012 Feb 15; 676:34–40.
33. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, physiopathology and pharmacology. Pharmacol. Rev. 1991 Jun; 43(2):109–21
34. Milovanovic M, Nilsson E, Jaremo P. Relationships between platelets and inflammatory markers in rheumatoid arthritis. Clin. Chim. Acta. 2004; 343(1–2):237–40.
35. Klimiuk PA, Sierakowski S, Chwiecko J. Serum interleukin 6 (Il-6) concentration correlates with matrix mettaloproteinases and their tissue inhibitors in rheumatoid arthritis. Pol. Arch. Med. Wewn. 2003; 109(2), 119–23.
36. Bharadwaj D, Stein MP, Vozer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C reactive protein on leukocytes is FC-γ receptor II. J. Exp. Med. 1999 August 16; 190(4):585–90.
37. Gravallese EM, Goldring SR. Cellular mechanism and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2000 Oct; 43(10):2143–51.
38. Smolen JS & Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. Nat. Rev. Drug Discov. 2003 Jun; 2:473–8.
39. Munro R, Morisson E, McDonald AG, Hunter JA, Madhok R, Capell HA, Effect of disease modifying agents on the lipid profiles of patients with rheumatoid arthritis, Ann. Rheum. Dis. 1997; 56:374–7.
40. Selph JL, Boncek VM, Soroko FE, Harris TM, Cochran FR. The pharmacologic evaluation of locomotor activity versus inflammatory parameters in rat adjuvant arthritis, Agents Actions 1993; 39:C201–3
41. Choi HK. Diet and rheumatoid arthritis: red meat and beyond. Arthritis Rheum. 2004; 50:3745–7
42. Maria M, Engeniusz M, Miroslaw K, Maria K, Iwona P. Adjuvant induced disease in rats, clinical findings and morphological and biochemical changes in the blood histological changes in internal organs. Rheumatology. 1983; 2:231–45.