

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة فرحات عباس - سطيف
UNIVERSITE FERHAT Abbas -SETIF-
Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire

Présenté Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

En Biochimie et physiologie expérimentale
Option : Effets biologiques des substances naturelles

Par
MEZITI Hicham

THEME

**Evaluation de l'effet anti-inflammatoire et
antioxydant des extraits de *Malva parviflora L.***

Soutenu le :

Devant la Commission d'Examen

Président	Dr. SENATOR Abderahmane	Université de Sétif
Rapporteur	Dr. BOURICHE Hamama	Université de Sétif
Examineur	Dr. MEHDADI Rachid	Université de Sétif
Examineur	Dr. BELHATTAB Rachid	Université de Sétif

SOMMAIRE

INTRODUCTION

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Inflammation	01
I. 1. Inflammation aiguë	01
1. 1. 1. La phase vasculaire	01
1. 1. 2. La phase cellulaire	03
1. 1. 3. La phase de résolution	04
1. 2. Inflammation chronique	05
1. 3. Cellules impliquées dans la réaction inflammatoire	05
1. 4. Médiateurs de la réaction inflammatoire	06
1. 5. Implications pathologiques de l'inflammation	07
1. 6. Anti-inflammatoires	07
1. 6. 1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens	07
1. 6. 2. Anti-inflammatoires stéroïdiens	10
1. 6. 3. Anti-inflammatoires d'origine végétal	11
II. Stress oxydant	15
2. 1. Espèces oxygénées réactives	15
2. 2. Sources des espèces oxygénées réactive	17
2. 2. 1. Sources endogène	17
a) Chaîne respiratoire mitochondriale	18
b) Cellules phagocytaires	18
c) Xanthine oxydase	18
d) Cyclooxygénase et lipoxygénase	20
e) Nitrique oxyde synthase	20
f) Réticulum endoplasmique	20
2. 2. 2. Sources exogènes	21
2.3. Conséquences biologiques du Stress oxydant	22
2.4. Implications pathologiques des espèces oxygénées réactives	23
2.5. Défenses antioxydantes	24
2.5.1. Antioxydants enzymatiques	24
2.5.2. Antioxydants non enzymatiques	26
2.5.3. Antioxydants d'origine végétale	26
a) Vitamine C	28
b) Vitamine E	28
c) Caroténoïdes	28
e) Composés phénoliques	28
e) Oligoéléments	30
III. La plante <i>Malva parviflora</i> L.	32
3.1. Classification de la plante <i>Malva parviflora</i> L.	32
3.2. Aspect botanique de la plante <i>Malva parviflora</i> L.	32
3.3. Usage thérapeutique traditionnel de <i>Malva parviflora</i> L.	33
3.4. Activités biologiques des <i>Malva sp.</i>	33

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS37

1. 1. Réactifs	37
1. 2. Animaux	37
1. 3. Matériel végétal	37

II. METHODES38

2.1. Préparation des solutions de travail	38
2.2. Extractio	38
2.2.1. Préparation de l'extrait méthanolique des feuilles de <i>Malva parviflora</i>	38
2.2.2. Préparation de l'extrait aqueux des feuilles de <i>Malva parviflora</i>	39
2.3. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	39
2.3.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris	39
2.3.2. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris	39
2.3.3. Perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris	40
2.4. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	41
2.4.1. Effet scavenger du radical DPPH	41
2.4.2. Chélation du fer ferreux	41
2.5. Activité antioxydante <i>in vivo</i> : Capacité antioxydante totale du sang	42
2.6. Analyses statistique	43

RESULTATS

1. Préparation des extraits des feuilles de <i>Malva parviflora</i>	44
2. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> des extraits de <i>Malva parviflora</i>	44
2.1. Effet des extraits des feuilles de <i>Malva parviflora</i> sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris	44
2.2. Effet des extraits des feuilles de <i>Malva parviflora</i> sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris	46
2.3. Effet des extraits des feuilles de <i>Malva parviflora</i> sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris	48
3. Activité antioxydante des extraits de <i>Malva parviflora</i>	50
3.1. Activité antioxydante <i>in vitro</i> des extraits des feuilles de <i>Malva parviflora</i>	50
3.1.1. Effet scavenger du radical DPPH	50
3.1.2. Chélation du fer ferreux	52
3.2. Effet <i>in vivo</i> des extraits des feuilles de <i>Malva parviflora</i> sur La capacité antioxydante totale du Sang	54

DISCUSSION

1. Préparation des extraits de <i>Malva parviflora</i>	57
2. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> des extraits de <i>Malva parviflora</i>	57
2.1. Effet des extraits des feuilles de <i>Malva parviflora</i> sur l'œdème de l'oreille	57
2.2. Effet des extraits des feuilles de <i>Malva parviflora</i> sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris	61
3. Activité anti-oxydante	63
3.1. Activité anti-oxydante <i>in vitro</i> des extraits de <i>Malva parviflora</i>	63
3.2. Activité anti-oxydante <i>in vivo</i> des extraits de <i>malva parviflora</i>	66

Résumé

L'effet anti-inflammatoire et antioxydant de l'extrait méthanolique (E.Met) et de l'extrait aqueux (E.Aq) des feuilles de *Malva parviflora* a été investigué. L'administration par voie orale de 500 mg/kg et 360 mg/kg de E.Met ou E.Aq montre une inhibition significative de 41% et 36% respectivement de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. Ces effets sont comparable à celui de l'indométacine qui est un anti-inflammatoire standard. En outre, une inhibition significative de 57% de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton a été observée chez les souris traitées localement par 2 mg/oreille de E.Met, ce qui est significativement supérieur à celui de l'indométacine. l'extrait aqueux ne montre aucune inhibition dans le même teste. De même L'administration oral de 500 mg/kg ou 360 mg/kg de E.Met ou E.Aq exercent une inhibition de 36% et 40% respectivement de la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris. Ces deux résultats sont également comparables à ceux obtenus avec l'anti-inflammatoire standard. D'autr part, l'effet antioxydant des extraits des feuilles de *Malva parviflora* à été évalué en utilisant le teste du DPPH, le teste de chélation du fer ferreux. Les extraits E.Met et E.Aq ont montré un effet piègeur important vis-à-vis du radical DPPH avec des IC₅₀ de 89,03 ± 2,65 µg/ml et 76,67 ± 0,29 µg/ml respectivement. Ces valeurs sont comparable à celle de l'antioxydant standard (BHT). Les deux extraits étudiés possèdent également une activité chélatrice remarquable du fer ferreux avec des IC₅₀ de 346,71 ± 7,25 et 42,26 ± 0,61 µg/ml pour E.Met et E.Aq respectivement. L'effet antioxydant des extraits des feuilles de *Malva parviflora* a été confirmé *in vivo* par le teste de la capacité antioxydante totale du sang chez la souris. L'administration quotidienne de E.Met et de E.Aq durant trois semaines entraîne une amélioration dose dépendante de la capacité antioxydante totale. En conclusion, l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits des feuilles de *Malva parviflora* montre que cette plante possède un fort pouvoir pharmacologique, ce qui supporte son usage traditionnel médicinal et culinaire.

Mots clés: Inflammation, Stress oxydatif, *Malva parviflora*, Anti-inflammatoire, Antioxydant

Abstract

The anti-inflammatory and antioxidant effects of *Malva parviflora* leaf extracts were evaluated in this study. Results showed that the oral administration of 500 mg/kg of methanolic extract (E.Met) or 360 mg/kg of aqueous extract (E.Aq) exerted 41% and 36% of inhibition respectively in the xylene induced ear edema test in mice. These effects were statistically similar to the effect of indomethacin which is a standard anti-inflammatory. Moreover, the topical application of 2 mg/ear of E.Met inhibited significantly (57%) the croton oil induced ear edema. This inhibition was higher than that of indomethacin, whereas E.Aq did not show any activity. In the same way, the oral administration of E.Met and E.Aq at 500 and 360 mg/kg, exerted 36% and 40% of inhibition respectively of acetic acid induced vascular permeability in mice. These effects were statistically similar to the effect of indomethacin. On the other hand, the antioxidant effect was assessed using the DPPH and metal chelating activity tests. E.Met and E.Aq exhibited a strong scavenging activity against DPPH radical with IC₅₀ values of 89,03 ± 2,65 µg /ml and 76,67 ± 0,29 µg /ml respectively. The two extracts showed also an excellent metal chelating activity toward ferrous ions with IC₅₀ values of 346,71 ± 7,25 and 42,26 ± 0,61 µg/ml respectively. The antioxidant effect of *malva parviflora* extracts was confirmed *in vivo* using the blood total antioxidant capacity test in mice. The daily administration of E.Met and E.Aq during three weeks showed significant and dose dependent improvement of the blood total antioxidant capacity. Taken together, we conclude that *Malva parviflora leaf* extracts possess a strong anti-inflammatory and antioxidant activity which supports its traditional uses in the treatment of inflammatory disorders.

Key words: Inflammation, Oxidative stress, *Malva parviflora*, Anti-inflammatory, Antioxidant

الملخص

في هذه الدراسة تم تقدير التأثيرات المضادة للالتهاب والمضادة للأكسدة لكل من المستخلص الميثانولي (E.Met) والمستخلص المائي (E.Aq) من أوراق نبتة *Malva parviflora* . أدت معالجة *Malva parviflora* من أوراق نبتة (E.Aq) والمستخلص المائي (E.Met) الميثانولي

على التوالي E.Aq و E.Met الفئران عن طريق الفم بالجرعات 500 ملغ/كلغ أو 360 ملغ/كلغ من . في حين أظهرت المعالجة Xylène لوزمة الأذن المحفزة بـ % و 36% تثبيطا معنويا يقدر بـ 41 و لم Croton تثبيطا معنويا لوزمة الأذن المحفزة بزيت E.Met الموضعية للفئران بـ 2ملغ للأذن بـ يظهر المستخلص المائي أي تأثير في نفس التجربة. بالإضافة إلى ذلك أدت معالجة الفئران عن طريق على التوالي إلى تثبيط معنوي مقدر بـ E.Aq و E.Met الفم بـ 500 ملغ/كلغ أو 360 ملغ/كلغ من نشاطية E.Met و E.Aq لنفاذية الأوعية المحفزة بحمض الخل. من جهة أخرى أظهر % و 36% 40 0.29 ميكرو ± 2.65 و 76.67 ± مقدر بـ IC₅₀ 89.03 بقيم DPPH إزاحية معتبرة تجاه جذر قدرة عالية على التقاط أيونات الحديد بـ E.Aq و E.Met غرام/ملل على التوالي. كما أظهر كل من 0.61 ميكرو غرام/ملل على التوالي. علاوة على ± 7.25 و 42.26 ± مساوية لـ IC₅₀ 346.71 ذلك تم التأكد من التأثيرات المضادة للأكسدة للمستخلصات المدروسة باستعمال التجارب على الحيوان إلى تحسن معنوي للقدرة E.Aq و E.Met حيث أدت المعالجة اليومية للفئران لمدة 3 أسابيع بـ Malva الإجمالية المضادة للأكسدة للدم. من خلال النتائج المتحصل عليها نستخلص أن نبات يمتاز بخصائص علاجية مضادة للالتهاب ومضادة للأكسدة، ما يدعم استعمالها في الطب *parviflora* التقليدي.

، مضادات الالتهاب، *Malva parviflora* الكلمات المفتاحية: الالتهاب، الإجهاد التأكسدي،
مضاد/تأكسدة

INTRODUCTION

L'inflammation est un mécanisme de défense indispensable pour l'intégrité de l'organisme. Cependant, elle se trouve impliquée dans un très grand nombre de pathologies humaines. D'une autre part, le stress oxydant est également à l'origine de plusieurs maladies humaines allant de l'inflammation au cancer tout en passant par les maladies cardio-vasculaires et l'arthrite rhumatoïde. De ce fait, la recherche de substances d'origine végétale douées d'activités anti-inflammatoires et/ou antioxydante s'avère très utile pour l'amélioration de la santé humaine tout en évitant les effets indésirables des molécules desynthèse.

En Algérie la phytothérapie est utilisée depuis toujours dans le secteur de la médecine traditionnelle. Les pharmacopées régionales s'inspirent principalement de la médecine arabe classique et de l'expérience locale des populations en matière de soins. Aujourd'hui les plantes jouent encore un rôle très important dans les traditions médicales et la vie des habitants, mais les règles de leur utilisation manquent parfois de rigueur et ne tiennent pas compte des nouvelles exigences de la thérapeutique moderne. Ces dernières années, beaucoup de recherches se sont orientés vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sûreté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes.

Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail de recherche dont l'objectif essentiel consiste à vérifier l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits des feuilles de la plante *Malva parviflora* L. connue En Algérie sous le nom ; Khoubéiz ou Amedjir. Cette plante est utilisée en cuisine algérienne comme elle est utilisée traditionnellement pour le soulagement de diverses affections inflammatoires.

Dans ce présent travail nous avons fixé les objectifs suivants :

- Préparation des extraits méthanolique et aqueux des feuilles de *Malva parviflora*
- Evaluation de l'effet des extraits de *Malva parviflora* sur l'œdème de l'oreille chez la souris.
- Evaluation de l'effet des extraits de *Malva parviflora* administrés par voie orale sur la

perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris.

- Evaluation de l'activité inhibitrice des extraits de *Malva parviflora* vis-à-vis du radical DPPH
- Evaluation de l'activité chélatrice des extraits de *Malva parviflora* vis-à-vis du fer ferreux.
- Evaluation de l'effet des extraits de *Malva parviflora* sur la capacité antioxydante total du sang chez la souris.

1. Inflammation

L'inflammation est un processus physiologique de défense de l'organisme contre une agression qui entraîne une altération tissulaire. Elle peut être déclenchée par un traumatisme, une brûlure, une irradiation ou par la pénétration d'agents pathogènes extérieurs (virus, bactérie, parasite, antigènes) (Schoroderet, 1992). La fonction primaire de l'inflammation est d'éliminer l'agent agresseur et de permettre la réparation des tissus (Weill *et al.*, 2003). L'inflammation de courte durée dite inflammation aiguë est un phénomène bénéfique pour l'organisme qui lui permet de retrouver son intégrité physiologique. Alors que l'aspect négatif de l'inflammation intervient quand cette dernière se pérennise et devient une inflammation chronique. Dans ce cas la réaction inflammatoire doit être contrôlée par les médicaments (Weill *et al.*, 2003).

1.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est caractérisée par quatre phénomènes typiques qui sont l'œdème, la douleur, la chaleur et la rougeur. Elle peut également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (Botting et Botting, 2000). Elle dure de quelques jours à quelques semaines. L'inflammation aiguë peut être divisée en trois grandes phases ; une phase vasculaire immédiate (de l'ordre de minutes) caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des micro-organismes pathogènes et des tissus lésés, et une phase de résolution et de cicatrisation qui en quelques jours conduira à la restauration des tissus (Weill *et al.*, 2003) (figure 1).

1.1.1. La phase vasculaire

L'activation des plaquettes qui survient suite à une lésion tissulaire touchant ou pas les veinules ou les artérioles, constitue la première étape de la phase vasculaire (Steinhubl, 2007). Les mastocytes résidents qui peuvent aussi être activés par un très grand nombre de stimuli, sont également susceptibles d'initier la réaction inflammatoire (Botting et Botting, 2000).

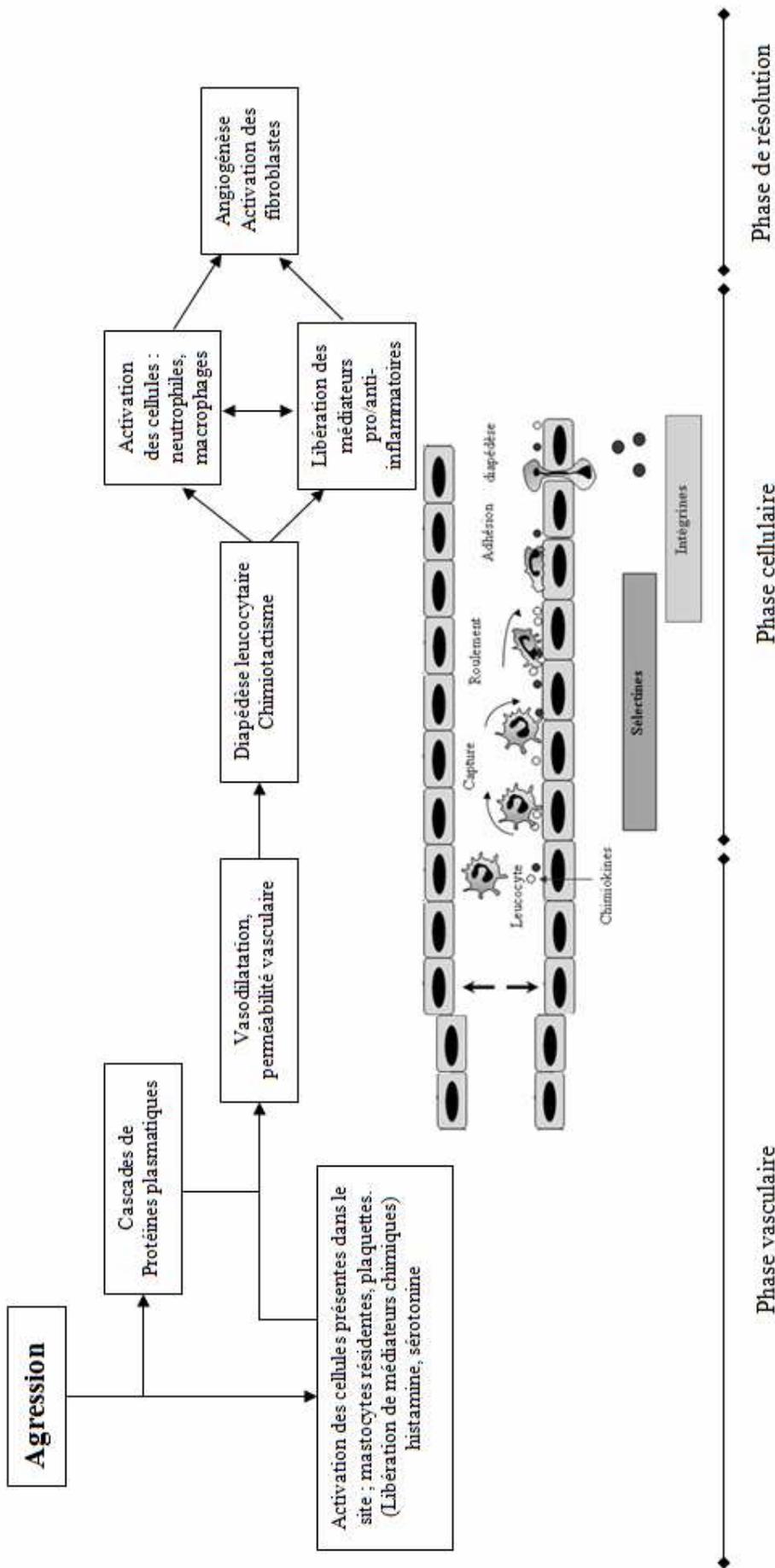


Figure 1 : Les phases de l'inflammation aigue (Adapté de Chevalier *et al.*, 2005).

Une fois ces deux types de cellules activés, plusieurs médiateurs tel que la sérotonine, l'histamine et des dérivés de l'acide arachidonique sont libérés. D'une autre part, l'activation de la cascade de coagulation et du système du complément qui surviennent suite à une agression externe conduit à la génération de divers médiateurs doués d'activités vasodilatatrice et chimioattractante comme le facteur XII, la fibrine, la bradykinine, C3a et C5a (Fauve et Hevin, 1998). Ceci induit une vasodilatation des vaisseaux sanguins avec une augmentation du débit locale et une modification de la perméabilité vasculaire. Cette dernière est due à l'augmentation des fenêtrures intercellulaires, ce qui permet l'extravasation des protéines plasmatiques vers les tissus (exsudation plasmatique). Les neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine sont également susceptibles de déclencher les évènements de la phase vasculaire de l'inflammation. Ce phénomène est connu sous le nom de l'inflammation neurogénique (Börzsei *et al.*, 2008). Suite à une stimulation, ces neurones libèrent principalement deux médiateurs ; la substance P et le peptide lié au gène de la calcitonine. Ces derniers induisent une vasodilatation et une exsudation plasmatique en agissant sur les cellules endothéliales et les muscles lisses des vaisseaux sanguins (Birklein et Schmelz, 2008). Comme ils peuvent activer directement les mastocytes et les autres cellules immunitaires. Il est également admis que les neurones sensoriels contiennent des cyclooxygénases capables de synthétiser les prostaglandines pro-inflammatoires (Richardson et Vasko, 2002). L'augmentation du débit micro-circulatoire au niveau du site enflammé explique partiellement l'apparition de chaleur et de rougeur. L'exsudation plasmatique induit un œdème par distension des tissus et provoque une hyper-pression sur les terminaisons nerveuse locales, ce qui explique les sensations de tuméfaction et de douleur (Weill *et al.*, 2003).

1.1.2. La phase cellulaire

L'exsudation plasmatique permet l'apparition de plusieurs substances dans les espaces extravasculaires : anticorps, substances bactéricides, facteurs de coagulation, composants du complément, kininogènes, interleukines, interférons et des dérivés de l'acide arachidonique. Ceci conduit à un afflux extravasculaire des leucocytes attirés par les chimioattractants existants dans l'exsudat et ceux libérés au niveau du site enflammé (Schoroderet, 1992). La première étape de

cet afflux consiste en une marginalisation des leucocytes grâce à l'expression d'adhésines (intégrines, sélectines, membres de la superfamille des immunoglobulines) au niveau des cellules endothéliales et des leucocytes activés (Fauve et Hevin, 1998). Ceci permet l'interaction entre l'endothélium et les phagocytes du sang, principalement les polynucléaires neutrophiles (PMNs) et les monocytes, et leur passage à travers les cellules endothéliales contractées sous l'effet de certains médiateurs inflammatoires tel que la bradykinine et certains dérivés de l'acide arachidonique (Schoroderet, 1992). Guidées par le gradient de concentration des chimioattractants, les leucocytes parviennent au tissu lésé (Weill *et al.*, 2003). Les monocytes achèvent leur différenciation en macrophages et amorcent avec les PMNs la phagocytose des agents extérieurs et/ou des débris cellulaires. De nombreuses protéases (collagénase, élastase) et des radicaux libres dérivés du métabolisme de l'oxygène et du monoxyde d'azote sont produits au cours de la phagocytose. Les effets cytotoxiques locaux de ces produits sont très importants (Fauve et Hevin, 1998).

1.1.3. La phase de résolution

Le rétablissement de l'homéostasie tissulaire après une agression nécessite d'abord l'arrêt de la réponse inflammatoire et ensuite la réparation des tissus lésés. L'arrêt de la réponse inflammatoire fait intervenir plusieurs médiateurs tel que les cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β 1), l'expression des récepteurs solubles comme TNF- α et l'apoptose des cellules inflammatoires (Eming *et al.*, 2007). La réparation des tissus fait intervenir les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Eming *et al.*, 2007). Dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles. Les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Le retour à un état physiologique consiste dans un premier temps à la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes (Weill *et al.*, 2003). Si l'atteinte est plus sérieuse et entraîne une destruction tissulaire, ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui produisent les protéines de la matrice intercellulaires comme le collagène, la fibronectine et la laminine, pour

permettre la reconstruction des tissus. Le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (Weill *et al.*, 2003).

1.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique se développe dans les conditions où persiste une agression ou dans les tissus soumis à des réactions auto-immunes, où l'antigène ne peut être éliminé (Rankin, 2004). Elle est caractérisée par une durée étalée sur des mois ou des années. Elle peut même se prolonger tout au long de la vie de l'individu (Fauve et Hevin, 1998). A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de l'inflammation. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentatives de réparation sont également présents (Weill *et al.*, 2003). Les cellules mononuclées et particulièrement les macrophages constituent l'essentiel de l'infiltrat cellulaire vers le site inflammatoire (Fauve et Hevin, 1998 ; Weill *et al.*, 2003). La présence de lymphocytes dans l'infiltrat est habituelle. Tandis que la présence des polynucléaires éosinophiles est caractéristique des inflammations chroniques allergiques et parasitaires (Dombrowicz et Capron, 2007).

1.3. Cellules impliquées dans la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire fait intervenir plusieurs types cellulaires :

Les polynucléaires neutrophiles représentent le composant cellulaire majeur de l'inflammation aiguë (40–75 % des cellules inflammatoires). Ils migrent sous l'effet des chimioattractants vers le site inflammatoire où ils phagocytent l'agent agresseur ou les débris cellulaires (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1999). Les neutrophiles libèrent différentes molécules tel que les protéinases, les radicaux libres, les chimokines et des cytokines pro-inflammatoires (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1996). Les polynucléaires neutrophiles sont également impliqués dans la réparation tissulaire (Eming *et al.*, 2007).

Les mastocytes sont des cellules résidentes des tissus conjonctifs. Ils jouent un rôle très important dans le déclenchement de la réaction inflammatoire (Weill *et al.*, 2003). Ils se caractérisent par la présence dans leur cytoplasme de très nombreuses granulations contenant des

médiateurs inflammatoires comme la sérotonine, l'histamine, l'héparine et des cytokines (Williams et Galli, 2000). Ils sont aussi impliqués dans la réparation tissulaire (Eming *et al.*, 2007).

Les monocytes sont des cellules mononuclées circulantes qui migrent vers le site inflammatoire et se différencient en macrophages. Ils ont pour rôle de phagocyter l'agent agresseur ou les fragments de tissus altérés (Descamps-Latscha et Witko-Sarsat, 1999). Ils interviennent aussi dans l'amplification de la réaction inflammatoire en libérant des médiateurs stimulant d'autres cellules inflammatoires. Les monocytes interviennent également dans la phase de réparation tissulaire (Eming *et al.*, 2007).

Les plaquettes sanguines sont indispensables à l'hémostase primaire. Elles contribuent au processus inflammatoire par la libération de nombreux médiateurs comme le fibrinogène, le plasminogène, des protéases plasmatiques ainsi que de la sérotonine (Medzhitov, 2008).

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

Les polynucléaires éosinophiles représentent de 1 à 6% des cellules inflammatoires. Elles possèdent aussi des propriétés phagocytaires (Rankin, 2004). Leur fonction principale est de s'attaquer aux parasites via le contenu de leurs granules. Elles interviennent aussi dans la modulation et la propagation de la réponse immunitaire adaptative en activant directement les lymphocytes T (Hogan *et al.*, 2008).

1.4. Médiateurs de la réaction inflammatoire

Les changements locaux qui surviennent au niveau du site inflammatoire sont le résultat de la formation et/ou la libération séquentielle de médiateurs pro et anti-inflammatoires de nature divers ; amine (histamine et sérotonine), médiateurs lipidiques (prostaglandines et leukotrienes), et des cytokines de nature peptidique, protéique ou glycoprotéique. (Botting et Botting, 2000). (tableau 1)

Tableau 1. Origines cellulaires et effets des principaux médiateurs inflammatoires. (Adapté de Rankin, 2004; Male *et al.*, 2007).

Médiateurs	Origine	Actions
Histamine	Mastocytes, basophiles, éosinophiles et plaquettes.	Assure la vasodilatation, augmente la perméabilité vasculaire, induit l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire.
Sérotonine	Mastocytes et plaquettes.	Augmente la perméabilité vasculaire, dilate les capillaires et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur activateur des plaquette (PAF)	Plaquette, neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales.	Assure la vasodilatation, augmente l'adhésivité de la paroi vasculaire, stimule la bronchoconstriction, l'aggregation des plaquettes et la libération des médiateurs qu'elles renferment, induit la production des EOR et la libération des enzymes lysosomiales par les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages.
Kalicréine	Présente dans le plasma	Transforme et active le système des Kinines
Plasmine	Présente dans le plasma	Clive le composant du complément C ₃ pour générer le C3a et le C3b
Leucotriènes : -LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄	Essentiellement par les leucocytes	Augmentent la perméabilité des micro- vaisseaux.
-LTB ₄	Essentiellement par les leucocytes	Augmente la perméabilité vasculaire et le flux sanguin local, induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des EOR et attire et active les cellules inflammatoires.
Prostaglandine E2	Essentiellement par les leucocytes	Provoque la vasodilatation, renforce l'action de l'histamine, de la bradykinine et des leucotriènes, augmente la sensibilité des neurones et est responsable de la douleur.
Bradykinine	Présente dans le plasma sous forme de kininogènes.	Accroît la vasodilatation, la perméabilité vasculaire et stimule la contraction des muscles lisses.
Facteur de Hagman (XII)	Présent dans le plasma et est activé par l'adhésion des plaquettes.	Impliqué dans la cascade de coagulation.
Thrombine	Présente dans le plasma	Catalyse la transformation du fibrinogène en fibrine et induit la libération de la sérotonine des plaquette.
Fibrine	Présente dans le plasma, formée à partir du finbrinogène	Intervient dans la formation du caillot sanguin.
IL-8	Monocytes, macrophages, plaquettes et lymphocytes.	Active le chimiotactisme des neutrophiles, des monocytes et des macrophages. Induit la libération des enzymes lysosomiales et la production des EOR. Intervient dans la réparation tissulaire
C3a	Fraction C3 du complément inactif.	Provoque la dégranulation des mastocytes.
C5a	Fraction C5 du complément inactif	Provoque la dégranulation des mastocytes et des neutrophile, exerce un effet chimiotactique en vers les phagocytes et stimule la contraction du muscle lisse.

1.5. Implications pathologiques de l'inflammation

L'inflammation est un mécanisme de défense indispensable pour l'intégrité de l'organisme. Cependant, l'implication de l'inflammation dans plusieurs pathologies humaines est bien évidente. Le tableau 2 cite quelques exemples.

Tableau 2. Exemples de maladies liées à l'inflammation (Nathan, 2002).

Désordres dans les quelles le rôle pathogénique principal revient à l'inflammation	
Asthme	Polyarthrite rhumatoïde
Artériosclérose	Arthrose
Goutte	Thyroïdite d'Hashimoto
Maladie d'Alzheimer	Lupus érythémateux disséminé
Eczéma	Maladie de Crohn
Spondylarthrite ankylosante	Rectocolite hémorragique
Broncho-pneumopathie chronique obstructive	
Maladies d'origine infectieux dans les quelle l'inflammation contribue dans la pathologie	
Hépatite C	
Tuberculose	
Gastrite induite par <i>Helicobacter pilory</i>	
Tuberculose	
Dysenterie bactérienne	
Maladies d'origines divers dans les quelles la fibrose poste inflammatoire est la cause principale de la pathologie	
Fibrose pulmonaire idiopathique	
Cirrhose hépatique poste virale ou alcoolique	
Bilharziose	

1.6. Anti-inflammatoires

1.6.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont été utilisés avec succès pour le soulagement de la douleur, la fièvre et l'inflammation depuis plus de 3000 ans et ils sont toujours utilisés quotidiennement par des millions de patients à travers le monde. Ce sont des médicaments à propriétés anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques. Ils présentent une grande hétérogénéité chimique (tableau 3) mais ils ont en commun l'inhibition non-sélective de l'enzyme cyclooxygénase (Bidaut-Russel, 2008).

Tableau 3. Exemples d'anti-inflammatoires non stéroïdiens. (Mark *et al.*, 2004).

Classe structurale	Nom scientifique	Nom commercial
Salicylates	Acétylsalicylique	Aspirine
	Salsalate (Sodium salicylates)	/
	Diflusal	Dolobid
Dérivés d'acide propionique	Ibuprofène	Ibuprofène
	Fenoprofène calcium	Nalfon
	Flurbiprofène	Ansaid
	Ketoprofène	Nalfon
Dérivés d'acide acétique	Diclofénac	Voltarene
Indoles	Indométacine	Indocine
	Tolmétin	Tolectine
	Sulindac	Clinoril

Cependant, l'usage des AINS est associé à de nombreux effets indésirables avec une prévalence considérable de nouvelles maladies et de mortalité (Bidaut-Russell, 2001). Les effets secondaires du traitement par les AINS sont attribués à leur inhibition non sélective des isoformes de la cyclooxygénase dont la COX-1 qui est présente de façon constitutive dans la plupart des tissus humains. Celle-ci a pour rôle la régulation d'un nombre de processus physiologiques tel que la maintenance de l'intégrité de la muqueuse gastrique, la fonction rénale, et l'agrégation plaquettaire (Vonkeman *et al.*, 2008). Pour cette raison, les laboratoires de

l'industrie pharmaceutique ont essayé de développer des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 qui est une enzyme induite après l'exposition de l'organisme aux stimuli inflammatoires. Celle-ci induit (avec d'autres médiateurs) une réponse inflammatoire subséquente (Vonkeman *et al.*, 2008).

De nouveaux médicaments ont été mis sur le marché depuis l'an 2000 tel que le rofecoxib (Vioxx[®]) et le célécoxib (Celebrex[®]), avec une efficacité comparable et une meilleure tolérance gastro-intestinale (Weir *et al.*, 2003). Mais en 2004, le rofécoxib a été retiré du marché à la demande de la firme qui le commercialisait car son utilisation sur le long terme semble avoir entraîné de très nombreux accidents cardiovasculaires et décès (Jüni *et al.*, 2004).

1.6.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou les glucocorticoïdes constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol (tableau 4). Ils représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immunes (Payne et Adcock., 2001). Leur mécanisme d'action est le même que celui des glucocorticoïdes endogènes. Ils se lient au récepteur des glucocorticoïdes dans le cytoplasme induisant ainsi sa dimérisation et sa translocation vers le noyau où il se lie à son élément de réponse sur les gènes appropriés. Ceci conduit à une élévation de la transcription des gènes codants pour les protéines anti-inflammatoires tel que la lipocortine-1 et l'interleukine 10, avec une inhibition de l'expression de plusieurs gènes codants pour des protéines pro-inflammatoires incluant des cytokines, des enzymes, des récepteurs et des molécules d'adhésion (Barnes., 1998).

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

Tableau 4. Principaux glucocorticoïdes (Henzen, 2003).

Glucocorticoïde	Nom commercial
Cortisol (Hydrocortisone)	Hydrocortone, Solu-Cortef
Cortisone	Cortison CIBA
Prednisone	Prednison Streuli
Prednisolone	Spiricort, Ultracorten
Methylprednisolone	Urbason, Solu-Medrol
Triamcinolone	Kenacort, Ledercort
Bétaméthasone	Celestene, Diprostene
Dexaméthasone	Fortecortin, Decadron

1.6.3. Anti-inflammatoires d'origine végétal

Les plantes médicinales sont très utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde pour le soulagement des maladies inflammatoires tel que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, la bronchite l'eczéma, l'arthrose, la goutte, la rhinite allergique, les ulcères gastriques et duodénaux (Setty et Sigal, 2005 ; Wiart, 2006). Le tableau 5 montre quelques plantes médicinales traditionnelles avec leurs usages.

L'activité anti-inflammatoire de ces plantes revient à leur contenu en métabolites secondaires doués d'activités biologiques; polyphénols, stérols, alcaloïdes, saponines, coumarines, terpènes et polysaccharides...ext.

Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'effet anti-inflammatoire d'un grand nombre de ces plantes ainsi que le mécanisme d'action de plusieurs d'entre elles. Les substances actives des plantes peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique, les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion, l'activation du facteur nucléaire kappa-B et la production des espèces oxygénées réactives ((Dowiejua et Zeitlin, 1993 ; Lwalewa *et al*, 2007).

Dans ce contexte, plusieurs exemples de plantes peuvent être cités :

Curcuma longa (curcuma) contient un pigment jaune appelé curcumine, un polyphénol qui inhibe la production de la prostaglandine E2 et l'expression de la cyclooxygénase 2 (Madden *et al.*, 2009). En revanche, il n'exerce aucun effet sur l'expression de la cyclooxygénase 1. Le curcumine inhibe aussi l'expression des gènes de L'IL-6 et de L'IL-8 et diminue de manière dose dépendante la production de NO et l'expression de l'enzyme NO Synthase (NOS) inductible (Mathy *et al.*, 2007). Le curcumine inhibe également le facteur nucléaire kappa-B (Aggarwal et Sung, 2008).

Zingiber officinale (gingembre), utilisé en médecine asiatique pour traiter les inflammations et les rhumatismes. Il contient un grand nombre de constituants; gingerol, beta-carotène, capsaïcine, acide caféique et curcumine, dont l'activité anti-inflammatoire est bien évidente. Les extraits du rhizome du gingembre sont de puissants inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes, comme ils inhibent la production du TNF- α en agissant sur l'expression des gènes (Setty et Sigal, 2005).

Baccharis trimera (Guayapi Tropical), une plante médicinale utilisée pour le traitement du rhumatisme. Elle contient un diterpénoïde qui montre une inhibition importante de la phospholipase A2 (Januário *et al.*, 2004).

Arnica montana (Arnica) est également très utilisée par les occidentaux pour le traitement des œdèmes et des meurtrissures. Son effet anti-inflammatoire revient à ces sesquiterpènes lactones tel que le helenaline et le dihydrohelenaline qui inhibent l'activation du facteur de transcription du Facteur nucléaire kappa-B, impliqué dans la transcription de médiateurs pro-inflammatoires (Wiert, 2006).

Harpagophytum procumbens (griffe du diable) est une plante issue de la médecine traditionnelle africaine. Son activité anti-inflammatoire a été largement investiguée *in vivo* et *in vitro*. Cette plante réduit significativement l'œdème de la patte induit par le Carrageenan (Catelan *et al.*, 2006). Elle inhibe la synthèse des eicosanoïdes, comme elle inhibe la production du TNF- α par les monocytes humains. Elle réduit également la production de la

myelopéroxydase par les neutrophiles et bloque la synthèse de la prostaglandine E2 (Setty et Sigal, 2005).

Tableau 5. Exemples de plantes médicinales anti-inflammatoires (Adapté de Erdemoglu *et al.*, 2003 ; Setty et Sigal, 2005).

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Nom commun	Utilisation
<i>Zingiber officinale</i>	Zingiberaceae	rhizome	gingembre	arthrose, migraine, douleurs rhumatismales
<i>Helleborus orientalis</i> L.	Ranunculaceae	racines	lenten-rose	œdèmes, douleurs rhumatismales
<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	feuilles racines	ortie	rinite allergique, eczéma goutte, douleurs rhumatismales
<i>Laurocerasus officinalis</i> R.	Rosaceae	feuilles graines	laurier	fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes
<i>Curcuma longa</i>	Zingiberaceae	rhizome	curcuma	douleurs rhumatismales, lupus systémique, psoriasis, infections rénales
<i>Ocimum basilicum</i>	Lamiacées	feuilles	basilic	lombalgie, arthrose
<i>Rubus sanctus</i> Schreber	Rosaceae	racines	ronces	douleurs rhumatismales, infections rénales, hémorroïde
<i>Nerium oleander</i> L.	Apocynaceae	fleurs	laurier rose	douleurs, maux de tête
<i>Harpagophytum procumbens</i>	Pédaliacées	tubercule	griffe du diable	arthrose, lombalgie, nevralgie, maux de tête, fièvre
<i>Rhododendron ponticum</i> L.	Ericaceae	feuilles	rhododendron pontique	oedèmes, états grippaux, mal de dents
<i>Juglans regia</i> L.	Juglandaceae	feuilles fruits	noyer commun	douleurs rhumatismales, fièvre, eczéma. douleurs rhumatismales, malaria
<i>Oenothera biennis</i>	Onagraceae	graines	onagre bisannuelle	douleurs rhumatismales, syndrome de sjögren

Urtica dioica (ortie) est une plante très utilisée dans la région méditerranéenne pour le soulagement de la rhinite allergique, l'eczéma et les douleurs arthritiques. Les extraits de l'ortie inhibent la dégradation protéolytique de l'inhibiteur I kappa-B (Ik-B), ce qui empêche l'activation du Facteur nucléaire kappa-B (Lin *et al*, 1995). Une autre activité des extraits de l'ortie est l'inhibition du facteur de transcription AP-1. Des études antérieures ont montré que l'inhibition de AP-1 prévient l'arthrite induite par le collagène (Setty et Sigal, 2005).

2. Stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants, que ce soit par une augmentation de la production d'espèces oxygénées réactives et/ou par une diminution des défenses antioxydantes (Halliwell et Whiteman, 2004). Ceci conduit à des endommagements cellulaires et tissulaires souvent irréversibles (Sorg, 2004).

2.1. Espèces oxygénées réactives

L'oxydo-réduction est le transfert d'un ou plusieurs électrons d'un atome vers un autre. Un tel processus est nécessaire pour la vie en aérobie et pour notre organisme, puisque l'oxygène est l'accepteur ultime d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP. Plusieurs autres réactions biologiques impliquent l'oxydation de substrats où l'accepteur d'électrons est l'oxygène moléculaire. Cependant, dans le cas où il y a un transfert d'un nombre d'électrons impair, nous assistons à la formation d'espèces toxiques tel que le radical superoxyde, le radical hydroxyle et le monoxyde d'azote, ayant des électrons non appariés (célibataires), ce qui leur confère une réactivité importante (Kocchilin-Ramonatxo, 2006). Ces espèces toxiques sont appelées radicaux libres et font partie de la classe des espèces oxygénées réactives (EOR) ou reactive oxygen species (ROS) selon les anglo-saxons. Cette classe comprend en plus des radicaux libre, certains dérivés réactives non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène et le peroxydinitrite (Bartosz, 2003 ; Halliwell et Whiteman, 2004) (Tableau 6).

Du fait de leur caractère très électrophile, les espèces radicalaires vont tenter de rattraper leurs électrons célibataires en agressant toute molécule susceptible de se faire arracher un électron (Lehucher-Michel *et al.*, 2001). La molécule agressée devient à son tour radicalaire et peut donc agresser d'autres molécules provoquant ainsi une perturbation de l'organisme (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).

La toxicité des EOR n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité. Dans plusieurs cas, des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demie vie longue qui leur permet de se diffuser et gagner des locations sensibles où elles

peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production (Kohen et nyska., 2002).

Tableau 6. Espèces oxygénées réactives générées dans les systèmes biologiques (Bartosz, 2003).

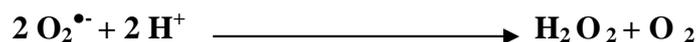
Espèces radicalaires	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\bullet-}$
Radical hydroxyle	OH^{\bullet}
Monoxyde d'azote	NO^{\bullet}
Espèces non radicalaires	Symbole
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulier	1O_2
Peroxynitrite	$ONOO^-$

Dans l'organisme une partie de l'oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors à la formation du précurseur des espèces oxygénées réactives : l'anion superoxyde (Kocchilin-Ramonatxo, 2006).



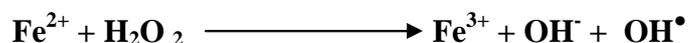
Le radical superoxyde est peu réactif, mais représente un précurseur d'espèces plus agressives tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est formé suite à une dismutation spontanée ou enzymatique du radical superoxyde par la superoxyde dismutase (Pal Yu, 1994).

Superoxyde dismutase

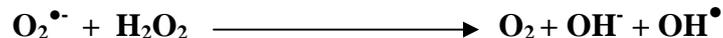


L'absence de charge à sa surface rend le peroxyde d'hydrogène très lipophile et peu réactif en milieu aqueux. Le peroxyde d'hydrogène peut néanmoins être considéré comme un dérivé réactif de l'oxygène potentiellement toxique car sa faible réactivité associée à sa capacité de traverser les membranes biologiques lui permet de se retrouver à une grande distance de son lieu de synthèse (Pal Yu, 1994 ; Cash *et al.*, 2007).

La dégradation de H_2O_2 en présence de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{2+}), conduit à la formation du radical hydroxyle selon la réaction de fenton (Sorg, 2004).



Selon la réaction d'Haber et Weiss, le H_2O_2 peut également réagir avec le radical superoxyde, aboutissant là encore à la production du radical hydroxyle (Sorg, 2004).



Avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, le radical hydroxyle est le plus réactif de toutes les EOR. Il réagit avec de nombreuses molécules se trouvant dans son voisinage (protéine, lipide, ADN) entraînant ainsi de multiples dommages (Guetteridge, 1993).

2.2. Sources des espèces oxygénées réactives

Les EOR sont produites dans l'organisme par de nombreux mécanismes tant endogènes qu'exogènes.

2.2.1. Sources endogène

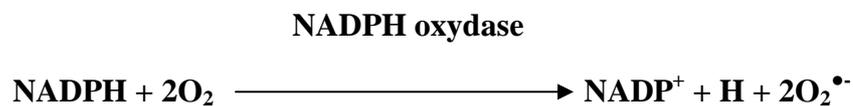
Divers types cellulaires et tissus donnent naissance au EOR par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normal et parfois en réponse à un stimulus spécifique (Figure 2).

a) Chaîne respiratoire mitochondriale

Au cours du métabolisme normale, la chaîne de transport d'électrons mitochondriale est la source la plus importante de la production des EOR (Chen *et al.*, 2003). Environ 5% de l'oxygène utilisé par les mitochondries est partiellement réduit par des électrons qui s'échappent des transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire. Une quantité de $O_2^{\bullet-}$ est alors formée. Celle-ci peut être amplifiée avec l'augmentation du volume de l'oxygène consommé dans certaines situations tel que l'augmentation de l'intensité respiratoire durant l'exercice physique et lors des désordres inflammatoires ou nutritionnels (Bartosz, 2003).

b) Cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires activées au cours de l'inflammation constituent une source importante de radicaux oxygénés. Ces radicaux sont produits directement lors d'un phénomène appelé explosion oxydative qui consiste en l'activation du complexe enzymatique ; NADPH oxydase, capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anion superoxyde au niveau de la membrane cellulaire (Athina *et al.*, 2006).



Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la destruction des bactéries et des corps étrangers phagocytés (Favier, 2003). De même, la myéloperoxydase lysosomale des cellules phagocytaires participe dans ce processus par sa production du HOCl à partir du H_2O_2 et du Cl^- (Rodrigues *et al.*, 2002).

c) Xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une enzyme qui joue un rôle important dans le catabolisme des purines. Elle génère des EOR lors de l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine, et de la xanthine en acide urique (Harrison, 2002).

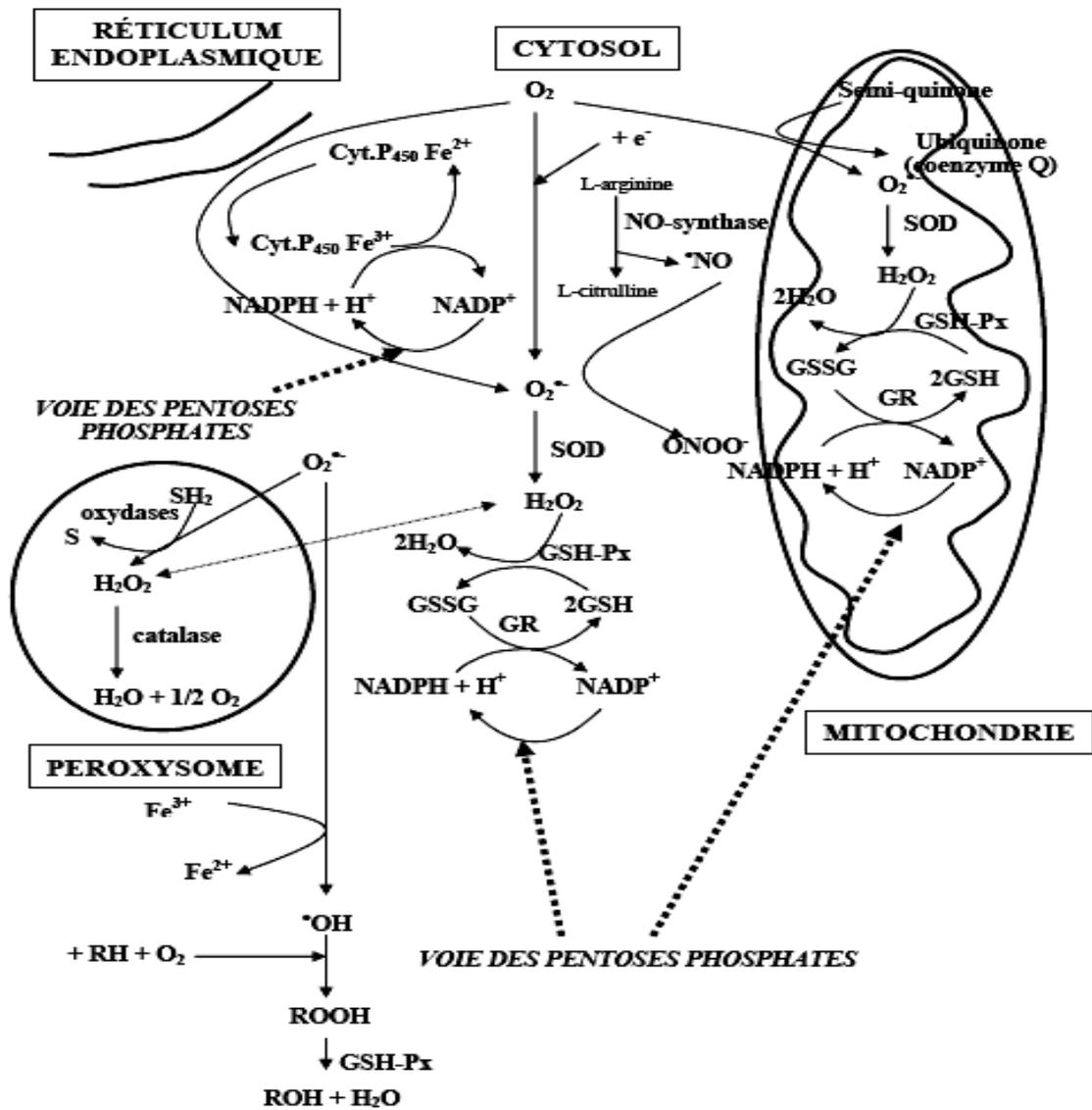
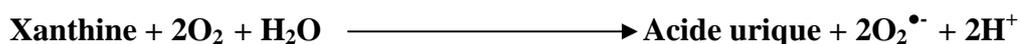


Figure 2 : Principales sources cellulaires des espèces oxygénées réactives

(Bonnefont-Rouselet, 2003).

Xanthine oxydase



La production des EOR par la xanthine oxydase est faible dans les conditions physiologiques normales, mais joue un rôle important lors de l'ischémie-reperfusion (Granger *et al.*, 1981).

d) Cyclooxygénase et lipoxygénase

L'activation des phospholipases induit la libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. L'acide arachidonique est métabolisé par la cyclooxygénase et la lipoxygénase en prostaglandines et leucotriènes. Cette voie implique un transfert d'électrons qui pourrait initier la formation des EOR, principalement de superoxyde (Densiov et Afanas'ev, 2005).

e) Nitrique oxyde synthase

Le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) est une espèce radicalaire synthétisée à partir de l'arginine par l'enzyme nitrique oxyde synthases. Cette production est physiologique et joue un rôle majeur dans la neurotransmission, la régulation de la pression sanguine, les mécanismes de défense, la relaxation des muscles lisses et la régulation immune (Valko *et al.*, 2007). Cependant, à une concentration élevée le NO^{\bullet} devient délétère pour les cellules notamment en réagissant avec le $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour former un puissant oxydant; le peroxydrite (ONOO^{\bullet}). Celui-ci peut se décomposer en d'autres oxydants comme le NO_2 et le OH^{\bullet} (Densiov et Afanas'ev, 2005).

f) Réticulum endoplasmique

Au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, la chaîne de transfert d'électron fait intervenir des cytochromes P450 qui peuvent produire des EOR au cours des réactions de détoxification des drogues et d'autres produits métaboliques toxiques. Ces réactions prennent lieu principalement au niveau du foie (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003).

2.2.2. Sources exogènes

L'organisme humain est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance aux EOR.

Les rayonnements sont par différents mécanismes des sources de radicaux libres, qu'il s'agisse des rayons ionisants X ou gamma, ou des rayons ultraviolets capables de produire des anions superoxydes ou de l'oxygène singulier (Beani, 1995).

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes impliquant principalement la xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase qui peuvent oxyder le métabolite principal de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production de superoxyde. L'éthanol stimule également la production d'anion superoxyde par induction de la transcription des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase et du cytochrome P 450 (Milane, 2004).

Des toxiques tels que le monoxyde d'azote (NO^\bullet) et le dioxyde d'azote (NO_2^\bullet), présents dans notre environnement (goudron, tabac, polluants industriels...ext.), participent à la genèse de radicaux libres. Ils sont responsables d'une auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires. Le NO^\bullet et le NO_2^\bullet peuvent aussi réagir avec l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires pour former de puissant oxydant ; le peroxyde d'azote (ONOO^\bullet) et le radical OH^\bullet (Pincemail *et al.*, 1998).

Une large variété de xénobiotiques (toxines, pesticides et herbicides) et médicaments (antibiotiques et anticancéreux) peuvent contribuer à la production des EOR qui se forment comme produits de leur métabolisme *in vivo* (Martínez -Cayuela, 1995).

Une partie des aliments consommés est oxydée et contient différents types d'oxydants tels que les peroxydes, les aldéhydes, les acides gras oxydés et les métaux de transition (Ames, 1986).

2.3. Conséquences biologiques du Stress oxydant

Le stress oxydatif conduit à des endommagements cellulaires et tissulaires souvent irréversibles (Sorg, 2004).

Les cibles biologiques susceptibles aux attaques radicalaires sont, les lipides, les protéines et l'acide desoxyribonucléique (Kohen et Nyska, 2002) (Figure 3).

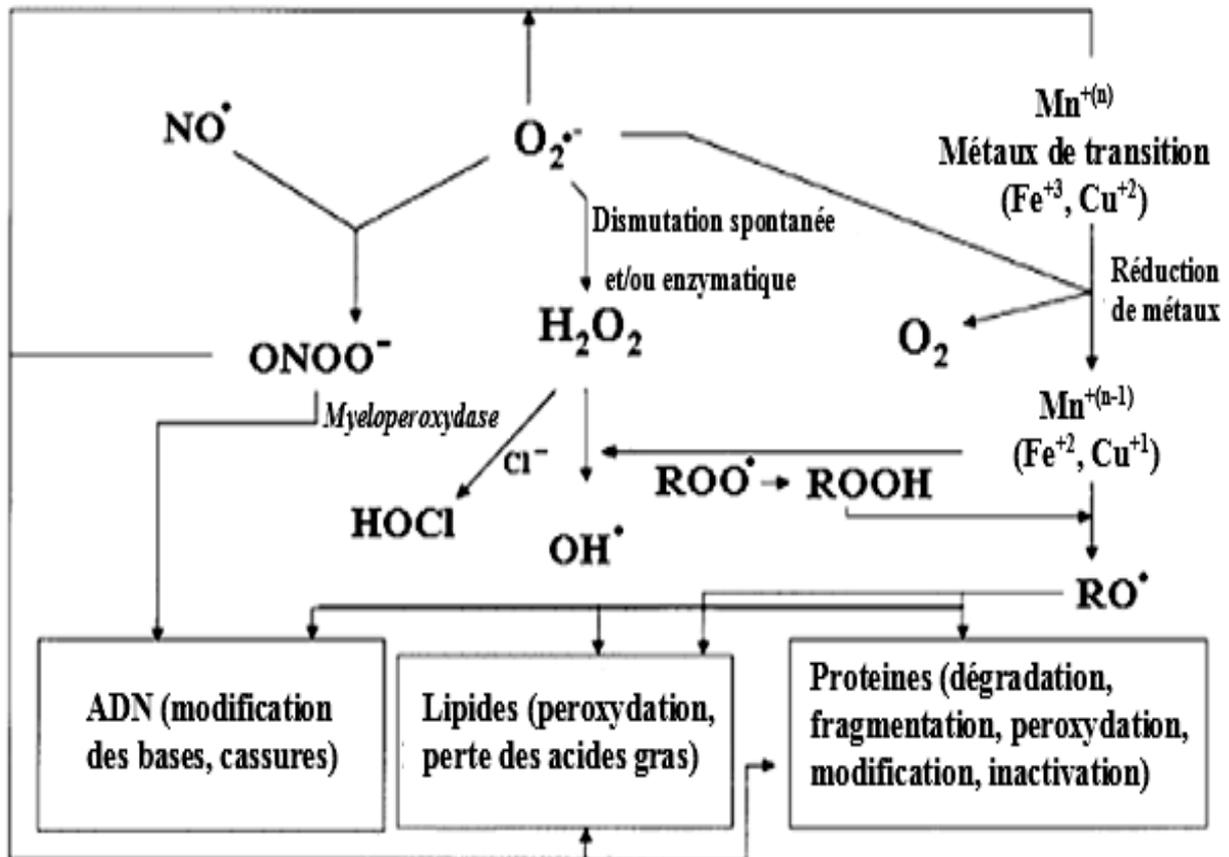


Figure 3 : Cibles biologiques et endommagement oxydatifs induits par les espèces oxygénées réactives (Kohen et Nyska, 2002).

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée des EOR. Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons sur les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires (Favier, 2003). Ceci conduit à des processus de peroxydation lipidique en chaîne aboutissant à la désorganisation complète de la membrane altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information (Beckman *et* Ames, 1998 ; Lehucher-Miche *et al.*, 2001).

Les EOR peuvent également s'attaquer aux protéines cellulaires. Les protéines les plus sensibles aux attaques sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH) (Favier, 2003). Des dommages importants peuvent être induits. Ces dommages sont soit sous forme de modifications structurales tel que la fragmentation des macromolécules; collagène et protéoglycannes, la formation de dimères ou d'agrégats protéiniques dans les membranes cytoplasmiques, ou sous forme de modifications fonctionnelles tel que l'inactivation des enzymes (Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Valko *et al.*, 2007).

Les ADN nucléaire et mitochondrial sont très sensible à l'attaque des les EOR. Les attaques radicalaires peuvent conduire à des modifications des bases, des cassures simples et doubles de la chaîne d'ADN, des sites abasiques et pontage avec des protéines (favier, 2003). De puissants systèmes de réparation (glycosylases, endonucléases) permettent d'assurer dans la plupart des cas la conservation du génome. Cependant, une surcharge de lésions en cas de stress important peut induire des effets mutagènes ou l'arrêt de la réplication de l'ADN conduisant à la mort cellulaire ou à la formation des cellules cancéreuses (Imlay et Linn, 1998).

2.4. Implications pathologiques des espèces oxygénées réactives

L'interaction des EOR avec les différentes molécules biologiques conduit à l'altération de l'homéostasie de l'organisme. Ceci fait que le stress oxydant intervient dans de nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé. De plus, la plupart des pathologies liées au stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale des EOR (Favier, 2003) avec une diminution de l'efficacité des systèmes de réparations et de dégradations des constituants oxydés (Sohal *et al.*, 2002). En fait, de nombreuses études tant épidémiologiques que cliniques ont démontré l'implication du stress oxydant dans le développement d'un grand nombre de pathologies humaines différentes allant de l'athérosclérose au cancer tout en passant par les maladies inflammatoires, cardiovasculaires, neurodégénératives et le diabète (Pincemail *et al.*, 2002)

(Tableau 7). Le rôle du stress oxydant dans le vieillissement à été également évoqué (Lehucher-Michel *et al.*, 2001 ; Valko *et al.*, 2007).

Tableau 7. Principales affections liées au stress oxydant.

Pathologies	Références
Lésions de reperfusion post-ischémique	(Zweier et Talukder, 2006)
Maladies auto-immunes	(Halliwell et guetteridge, 1999)
Arthrite rhumatoïde	(Ahsan <i>et al.</i> , 2003)
Maladies inflammatoires	(Densiov et Afanas'ev, 2005)
Athérosclérose	(Harrison <i>et al.</i> , 2003)
Maladies d'Alzheimer, de parkinson	(Sorg, 2004)
Emphysème	(Lechuer-Michel <i>et al.</i> , 2001)
Diabète sucré	(Pal Yu, 1994)
Certains cancers	(Valko <i>et al.</i> , 2007)
Anémie drépanocytaire	(Martinez-Cayuela, 1995)

2.5. Défenses antioxydantes

Pour contrarier les effets néfastes des espèces oxygénées réactives, l'organisme utilise un arsenal d'antioxydants qui ont pour rôle de ralentir ou d'inhiber les effets néfastes des espèces oxygénées réactives.

2.5.1. Antioxydants enzymatiques

Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase, la catalase, les glutathion peroxydase et réductase (Figure 4)

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. La SOD existe sous trois formes. La plus importante a pour cofacteurs le cuivre et le zinc (CuZn-SOD). Elle est présente dans le cytoplasme de toutes les cellules. Une deuxième forme a pour cofacteur le manganèse (Mn-SOD) et elle est située dans les mitochondries. La troisième forme a pour cofacteurs le

cuivre et le zinc. Elle est extracellulaire et se trouve au niveau de la lymphe et du plasma. Les trois formes de la SOD catalysent la même réaction mais diffèrent par leurs séquences d'acides aminés et leurs masses moléculaires (Zelko *et al.*, 2002).

La catalase (CAT) est présente en particulier dans les hématies et les peroxyosomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004).

La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du glutathion oxydé (GSSG) tout en utilisant le NADPH comme source d'hydrogène (Martínez-Cayuela, 1995 ; Sorg, 2004).

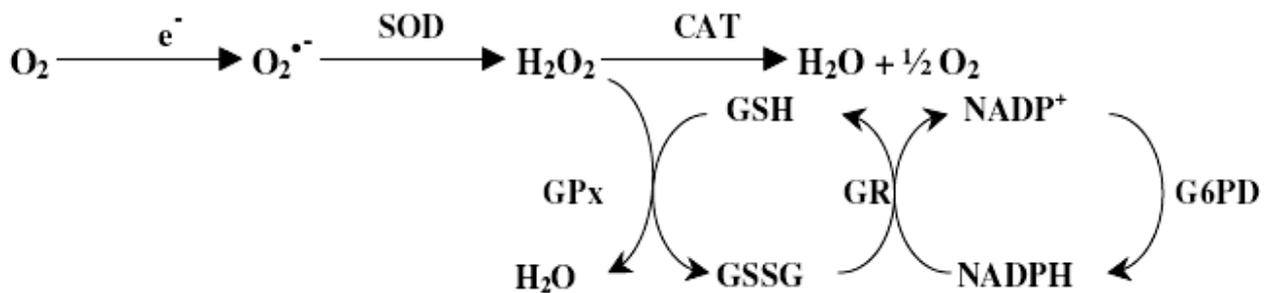


Figure 4 : Mécanisme réactionnel invoqué dans la détoxification enzymatique des espèces oxygénées réactives (Marfak, 2003)

2.5.2. Antioxydants non enzymatiques

Cette classe regroupe des composés endogènes de faible poids moléculaire qui peuvent être soit des produits de synthèse (glutathion, histidine dipeptide) ou issus du métabolisme cellulaire (acide urique) (Kohen et Nyska, 2002). Des protéines telles que la ferritine, la ceruloplasmine et l'albumine contribuent à leur tour dans la défense antioxydante secondaire en chélatant les métaux de transition permettant ainsi de prévenir la formation du radical hydroxyle via la réaction de fenton (Martínez-Cayuela, 1995).

2.5.3. Antioxydants d'origine végétale

Malgré que le concept du stress oxydant ne date que de quelques dizaines d'années, plusieurs plantes utilisées en médecine traditionnelle sont douées de propriétés anti-oxydantes remarquables. Ceci vient du fait que le stress oxydant est impliqué dans un grand nombre de maladies humaines et que l'idée derrière l'utilisation de plusieurs recettes traditionnelles est non le traitement des maladies mais leur prévention ainsi que de faire face au vieillissement (Scartezzini et Speroni, 2000).

Par exemple, Ayurveda est l'une des anciennes formules utilisées en Inde pour ce but. Cette formule contient de nombreuses plantes dont ; *Embllica officinalis*, *Curcuma longa*, *Mangifera indica*, *Momordica charantia*, *Santalum album*, *Swertia chirata* et *Withania somnifera*, qui ont un effet anti-oxydant confirmé par plusieurs études (Scartezzini et Speroni, 2000). L'effet anti-oxydant des plantes médicinales est dû à leur contenu en substances bioactives dites anti-oxydantes tel que les tannins, lignanes, coumarines, quinones, xanthones, acides phénoliques, flavones, flavonoles, anthocyanines et proanthocyanins (Marwah *et al*, 1991). Le tableau 8 montre quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-oxydantes.

Des études longitudinales montrent qu'un taux élevé d'antioxydants obtenus grâce à une alimentation riche en fruits et légumes réduit le risque relatif de mortalité dans diverses pathologies : cancers, maladies cardiovasculaires, et bronchopneumopathie. Les fruits et les légumes contiennent une grande variété d'antioxydants comme la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes, les oligoéléments et surtout les polyphénols (Defraigne et Pincemail, 2008).

Tableau 8. Exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-oxydantes. L'activité est confirmée par les tests : acide thiobarbiturique (TBA), évaluation de malonaldehyde par chromatographie phase gazeuse (MA/GC), 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), pouvoir réducteur du fer / pouvoir antioxydant (FRAP), aldéhyde / acide carboxylique (TCA) et diène conjugué (Moon et Shibamoto, 2009).

Nom scientifique	Nom commun	Méthodes testées	Composés actifs
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	réglisse	TBA, MA/GC	glycyrrhizine
<i>Zingiber officinalis</i>	gingembre	DPPH	6-gingerdiols
<i>Solanum lycopersicum</i>	tomates	FRAP	rutine, acide ascorbique, acide chlorogénique, lycopène
<i>Glycine max</i>	soja	ACA, MA/GC	eugénol, maltol, Alcool benzylrique
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme	TBA, FRAP	thymol, carvacrol, terpinène
<i>Rosmarinus officinalis</i>	romarin	Diène conjugué	acide carnosique
<i>Zanthoxylum piperitum</i>	poivre noir	TBA, DPPH	arbutine, magnoflorine
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalyptus	MA/GC, ACA	1,8-cineole, benzaldéhyde,
<i>Syzygium aromaticum</i>	Giroflier	MA/GC, ACA	eugénol, eugényl acétate
<i>Vitis vinifera</i>	raisin	β -carotène/ acide linoléique	Composés phénoliques

a) Vitamine C

La vitamine C ou l'acide ascorbique est le principal antioxydant hydrosoluble. Elle peut directement réagir avec les EOR comme le radical OH^\bullet ou $\text{O}_2^{\bullet-}$ et former un radical semidehydroascorbate peu réactif qui est rapidement oxydé en acide déshydroascorbique. La vitamine C inhibe également la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E. Cependant à forte dose et en présence de quantité importante de fer, la vitamine C peut devenir prooxydante (Densiov et Afanas'ev, 2005).

b) Vitamine E

La vitamine E ou α -tocophérol possède une structure qui lui permet de capter les radicaux libres non seulement dans les zones lipophiles des membranes cellulaires grâce à sa chaîne phytyle, mais aussi dans les zones hydrophiles à la surface des membranes plasmiques grâce à son hydroxyle phénolique. L' α -tocophérol réagit également avec les radicaux oxygénés lipidiques en empêchant leur propagation (Liebler, 2004 ; Traber et atkinson, 2007).

c) Caroténoïdes

Les caroténoïdes forme une grande famille de polyènes conjugué que l'on trouve en abondance dans les plantes et notamment les fruits et les légumes. A ce jour, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés, mais seul un nombre limité d'entre eux sont présents dans le sang humain et en quantité très faible. Les principaux sont l' α - et le β -carotène, la lutéine, la zéaxanthine, la cryptoxanthine et le lycopène. Les caroténoïdes possèdent des capacités antioxydantes similaires à celle des tocophérols. Grâce à leur longue chaîne carbonée riche en double liaison, ils sont d'excellents piègeurs de radicaux peroxyles et d'oxygène singulier (Sies et Stahl, 1995). La figure 5 résume le mécanisme probable par le quel la β -carotène et les vitamines C et E inhibent l'oxydation des lipoprotéines à faible densité.

e) Composés phénoliques

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de plus de 8000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques qui ont une caractéristique commune ; la présence

dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones. Celui-ci peut porter un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) (Hennebelle *et al.*, 2004).

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus nombreux (plus de 5000 molécules isolées) (Pietta, 2000). Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux dont plusieurs sont responsables des couleurs vives des fleurs, des fruits et des légumes (tableau 9) (Pietta, 2000; Ghedira, 2005). Les composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes

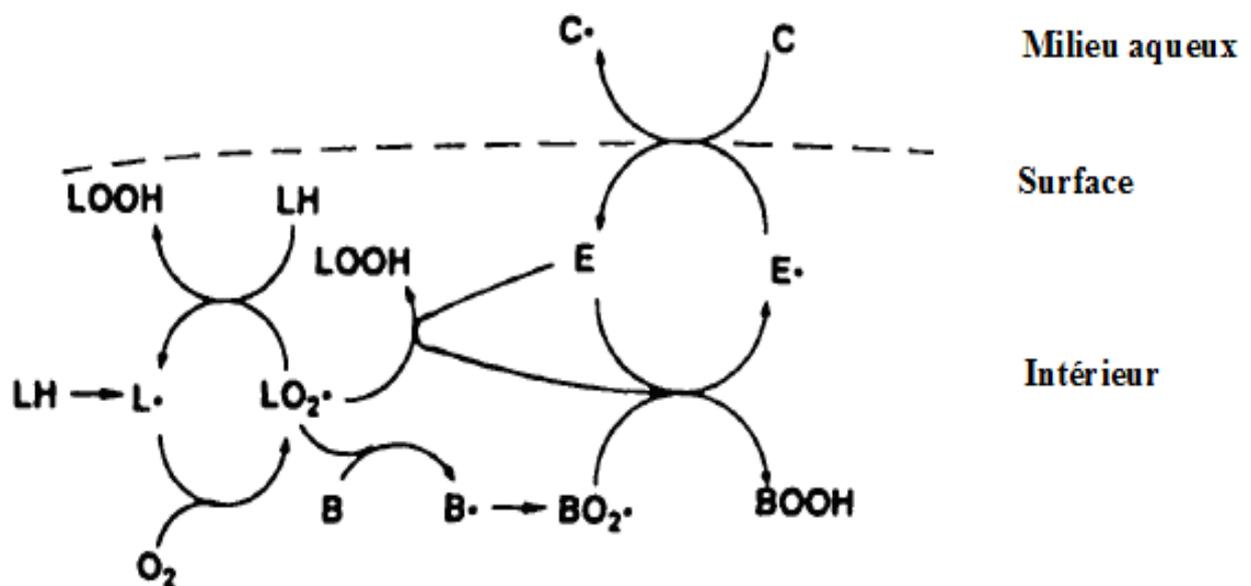


Figure 5 : mécanisme probable de l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines à faible densité par la β -carotène (B), la vitamine C (C) et la vitamine E (E). lipide (LH), peroxyde lipidique (LO_2^\bullet), hydroperoxyde lipidique (LOOH) (Niki *et al* 1995).

suscitent depuis une dizaine d'année un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et ainsi leur implication probable dans la prévention de diverses pathologies associées au stress oxydant. La propriété antioxydante des flavonoïdes la mieux décrite est leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles

(OH[•]), anions superoxydes (O₂^{•-}) et radicaux peroxylipidiques. Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif (Pietta, 2000 ; Ghedira, 2005). Ils peuvent également protéger les membranes cellulaires par leur action à différents niveaux sur la peroxydation lipidique. Ils sont aussi capables de capturer directement les composés radicalaires et d'interrompre ainsi la propagation de la réaction en radicalaire chaîne (Havsteen, 2002). Les flavonoïdes peuvent aussi inhiber la formation des radicaux libres par la chélation des métaux de transition tels que le cuivre (Cu⁺, Cu⁺²) et le fer (Fe⁺², Fe⁺³), impliqués dans la production des EOR *via* les réactions de Fenton et Haber-Weiss (Puppo, 1992).

e) **Oligoéléments**

Les oligoéléments (Cu, Zn, Se, Mn) ont aussi des propriétés antioxydantes. Ils servent notamment de cofacteurs aux enzymes antioxydantes (Berger, 2006).

Tableau 9. Exemples de composés phénoliques apportés par l'alimentation (Defraigne et Pincemail, 2008).

Polyphénol	Source alimentaire
Acides phénoliques	
Acide vanillique	Vanille
Acide galique	Thé
Acide cafeique	Café
Acide ferulique	Riz, Blé, Asperges
Acide chlorogénique	Pelure de pomme de terre Pomme, Artichaut
Resveratrol	Raisin
Flavonoïdes	
flavonols	
Quercétine, kaempferol	Oignon, Brocoli
Flavones	
Lutéoline	Céleri, Persil
Apigénine	Céleri, Romarin, Thym
Flavanones	
Naringénine	Agrumes
Flavines-3-ols	
Catéchine, épicatechine	Raisin, Thé vert, Cacao
Isoflavones	
Genistéine, daidzéine	Soja
Anthocyanidine	
Cyanidine	Fruits rouges, Raisin
Tanins	
Punicalagins	Grenade

3. La plante *Malva parviflora* L.

Malva parviflora L. est une plante appartenant à la famille des Malvaceae. Appelée communément la mauve. En Algérie, elle est connue sous le nom ; Khoubéiz ou Amedjir. Elle est très répandue à travers le monde. Elle se trouve dans la région méditerranéenne de l'Europe, en Asie moyenne et dans le nord d'Afrique. C'est une plante spontanée qu'on trouve dans les terrains incultes, le long des haies, au voisinage des maisons ou au bord des chemins. Elle est utilisée traditionnellement pour le traitement des affections inflammatoires. Elle est également utilisée en cuisine méditerranéenne dans diverses préparations.

3.1. Classification de la plante *Malva parviflora* L.

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Dialypétales

Ordre : Malvales

Genre : *Malva*

Famille : Malvacées

Espèce : *Malva parviflora*

3.2. Aspect botanique de la plante *Malva parviflora* L.

C'est une plante herbacée appartenant à la famille des Malvaceae. Cette plante a des tiges rameuses, un peu scabres, longues d'environ deux pieds. Les feuilles sont alternes, arrondies, en

cœur à la base, à sept lobes obtus peu profonds et à sept nervures principales. Elles sont crénelées, un peu tomenteuses, portées sur de très-longes pétioles. Les stipules sont ovales, pointues, ciliées. Sa racine est pivotante, et donne naissance à plusieurs tiges, dont la principale est droite, tandis que les latérales sont tombantes ou même totalement couchées à terre. Les fleurs sont très petites, assez nombreuses, et ramassées en groupes presque sessiles aux aisselles des feuilles. Les pétales débordent à peine les calices, ils sont blancs, légèrement teints de rose au sommet et bifides. Les folioles du calice externe sont filiformes et n'ont qu'à peine les deux tiers de la longueur du calice intérieur. Ce dernier est presque parfaitement glabre et divisé, dans son tiers supérieur en cinq découpures arrondies et acuminées qui s'évasent lors de la maturité des semences. Le fruit est circulaire, arrondi, glabre, comme ciselé, rude au toucher, déprimé dans son milieu et l'on remarque une petite pointe au centre de cette dépression. Il est moins grand que le calice et composé de dix à douze capsules monospermes striées ou ridées transversalement, légèrement creusées en gouttière dans leurs parties dorsales et denticulées à leurs bords (Jauzein, 1995) (figure 6).

3.3. Usage thérapeutique traditionnel de *Malva parviflora* L.

La mauve est utilisée en phytothérapie sous différentes formes ; la décoction ou l'infusion des feuilles est utilisée pour soulager les douleurs colitiques et comme laxatif pour la constipation (Moreno-Salazar *et al.*, 2008). Elle est également utilisée dans les états grippaux et surtout pour la toux sèche. Le gargarisme par la décoction et l'infusion de la mauve est employé pour l'inflammation de la bouche et les maux de gorge (pharyngite, laryngite, enrouement, extinction de voix) (Navarro Garcia *et al.*, 2003). Des compresses de feuilles sont appliquées localement pour le traitement des inflammations cutanées et des furoncles (Grierson et Afolayan, 1999).

3.4. Activités biologiques des *Malva* sp.

Très peu d'études ont été effectuées pour l'évaluation des activités biologiques de *Malva parviflora*. Cependant plusieurs autres espèces du genre "Malva" ont été largement étudiées. Les résultats publiés jusqu'à présent révèlent plusieurs effets biologiques d'un grand intérêt.

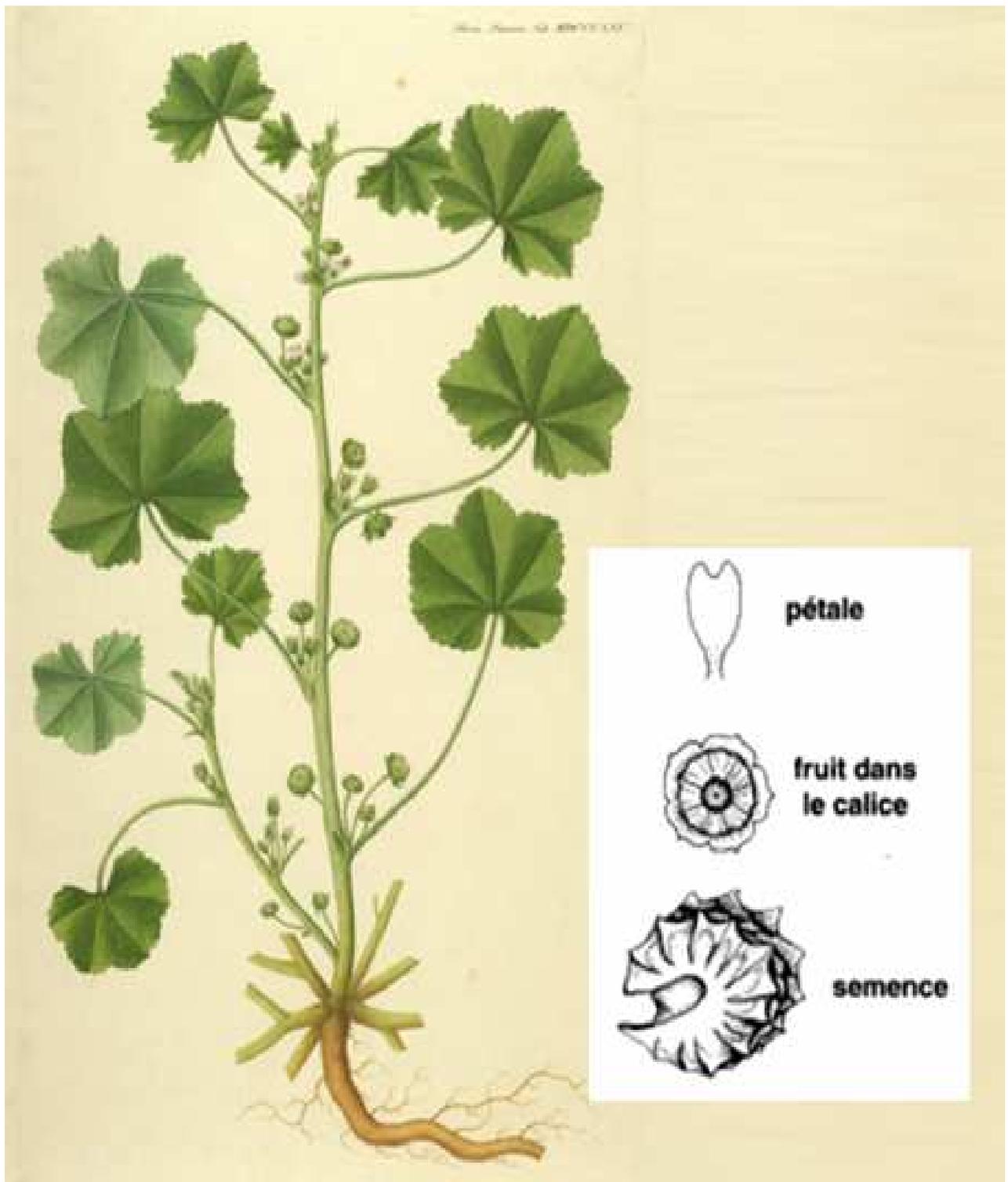


Figure 6: Aspect morphologique de la plante *Malva parviflora* L (Jauzein, 1995)

Tadeg et ses collaborateurs (2005) ont étudié l'effet anti-bactérien des extraits de huit plantes utilisées traditionnellement dans le traitement des infections cutanées. Leurs résultats montrent que l'extrait méthanolique des feuilles de *Malva parviflora* possède une activité antibactérienne envers *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, en plus d'une activité anti-fongique plus importante contre *Trichophyton mentagrophytes*. Cheng et Wang (2006) ont montré que *Malva sylvestris* (une espèce du même genre que *Malva parviflora*) disposent de propriétés bactériostatiques vis-à-vis du *Staphylococcus aureus*. Cette activité augmente avec le taux des anthocyanines de la plante dans le milieu de culture. Jimenez et ses collaborateurs (2003) ont montré que l'extrait Hénanique de *Malva parviflora* possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis de *Mucobacterium tuberculosis*. Xing et ses collaborateurs (2001) ont purifié trois protéines douées d'activité anti-microbienne importante à partir graines de *Malva parviflora*. Ces trois protéines ; CW-3, CW-4, et CW-5, ont probablement une action synergique. Les protéines ; CW-3, CW-4 ont montré un effet anti-fongique puissant contre *Phytophthora Infestans*, alors que CW-5 montre un effet envers *Fusarium graminearum*.

Les études menées par Mavi et ses collaborateurs (2004), montrent que l'extrait méthanolique des feuilles de *Malva neglecta* (une autre espèce du même genre que *Malva parviflora*) possède un effet anti-oxydant remarquable. Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique piège le radical DPPH avec une IC₅₀ de 2,24 mg/ml et inhibe la peroxydation lipidique dans les liposomes avec une IC₅₀ de 0,44 mg/ml. Dans une autre étude menée sur l'effet antioxydant de l'huile essentiel et de l'extrait aqueux des feuilles de *Malva sylvestris*, Ferreira et ses collaborateurs (2006) ont montré que l'huile essentiel ne présente aucune activité vis-à-vis du radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH). Cependant, il exerce une inhibition de 77 % du blanchissement de β-carotène. D'une autre part, La décoction montre une activité anti-radicalaire de 30% envers le DPPH et une inhibition de 78% du blanchissement de β-carotène. L'effet antioxydant de *malva parviflora* a été également étudié par Afolayan et ses collaborateurs (2008) qui ont montré que l'extrait méthanolique de *Malva parviflora* piège 94% du radical 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS).

L'effet anti-inflammatoire des extraits de *Malva parviflora* a été également étudié. Shale et ses collaborateurs (1999) ont montré que les extraits aqueux, méthanolique et hexanique des feuilles de *Malva parviflora* inhibent la synthèse des prostaglandines *in vitro*. Dans une étude ultérieure réalisée par Shale et ses collaborateurs (2005), L'extrait dichlorométhanique a été fractionné par chromatographie liquide. Les fractions obtenues ont montré une inhibition de 79% de la cyclooxygénase 2. Conforti et ses collaborateurs (2008) ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Malva sylvestris* inhibe l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.

Les études réalisées par Gurbuz et ses collaborateurs (2005) montrent que *Malva neglecta* possède aussi un effet Anti- ulcèrogénique. En effet, l'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante réduit de 89% les lésions gastriques dans le modèle de l'ulcère gastrique induit par l'éthanol chez le rat.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans la présente étude sont : Indométacine, ferrozine [3-(2-pyridyl)-5, 6-bis (4-phenyl-sulfonicacid)-1, 2, 4-triazine)], chlorure ferreux (FeCl_2), acide ethylenediamine tétraacétique (EDTA), 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl (AAPH), hydroxytoluene butylé (BHT) et huile de croton provenant de sigma (Allemagne). 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) provenant de Fluka (Allemagne). Bleu d'Evans obtenue auprès de RAL reactifs (France). Les sels utilisés pour la préparation des tampons sont obtenus auprès de Panreac (Espagne). Le méthanol, l'acétone, l'acide acétique et le xylène sont de grade analytique et obtenus auprès de Reidel, Prolabo et Sigma.

1.2. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris *Swiss albinos* dont le poids varie entre 25 et 30 g procurés aux prés de l'Institut Pasteur d' Alger. Les animaux répartis en groupes comportant 7 à 9 chacun, sont hébergés dans des cages de polypropylène à une température ambiante, avec accès libre à l'eau et à l'aliment fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia. Après une période d'adaptation de 7 jours, les souris sont pesées, marquées, et soumises à jeun pendant une nuit avant leur utilisation.

1.3. Matériel végétal

La plante *Malva parviflora* a été récoltée au mois d'avril 2008 de la région de Bordj Bou Arréridj. L'identification a été faite par Dr Laouar Houssin (laboratoire de botanique à l'université de Sétif). Les feuilles sont nettoyées, séchées à l'ombre et à température ambiante, puis stockées à l'abri de la lumière.

1.4. Solutions de travail

- Solution de l'huile de Croton 5,33 mg/ml : préparée en solubilisant l'huile de croton initialement dans l'acétone. L'eau distillée est ensuite ajoutée jusqu'à l'obtention du rapport acétone–eau (1:1).
- Bleu d'Evans 1% : préparé dans du NaCl 0.9%.
- Acide acétique 0,7% : préparé dans du NaCl 0.9%.
- Solution tampon PBS : préparée en mélangeant progressivement la solution de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mM) avec la solution de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mM) jusqu'à l'obtention d'un pH égale à 7.4. Le mélange obtenu est en suite supplémenté par du NaCl (125 mM).
- Solution de AAPH (150 mM) préparée dans la solution tampon PBS.
- FeCl_2 (0.6 mM) : préparée dans l'eau distillée.
- Ferrozine (5 μM) : préparée dans le méthanol.
- Les solutions de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *Malva parviflora* et de l'indométacine utilisées dans les essais *in vivo* sont fraîchement préparées dans du NaCl 0.9%.

2. Méthodes

2.1. Extraction

2.1.1. Préparation de l'extrait méthanolique des feuilles de *Malva parviflora*

L'extrait méthanolique est préparé selon la méthode de Tadeg et ses collaborateurs (2005). Les feuilles de *Malva parviflora* broyées sont mise à macérer dans un mélange méthanol/eau (8 : 2 V/V) à un rapport de 10 g/100 ml sous agitation douce pendant 48 heures à température ambiante. L'extrait hydroalcoolique est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange. Le méthanol est ensuite éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rotavapor (BÜCHI). L'extrait obtenu est lyophilisé (lyophilisateur PHYWE chrisa) pendant 12 heures. Une poudre brune foncée est obtenue.

2.1.2. Préparation de l'extrait aqueux des feuilles de *Malva parviflora*

L'extrait aqueux est préparé selon la méthode de Ferreira et ses collaborateurs (2006). Cinquante grammes de poudre de feuilles de *Malva parviflora* broyées sont mises à bouillir pendant 20 minutes dans 500 ml d'eau distillée. Après filtration, la solution obtenue est lyophilisée et une poudre brune claire est obtenue.

2.2. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

2.2.1. Œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris

Pour évaluer l'effet anti-œdémateux de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *Malva parviflora*, l'œdème de l'oreille est induit par le xylène selon la méthode de Rotelli et ses collaborateurs (2003). Quatre groupes de souris sont utilisés dans ce test.

Les souris des groupes traités reçoivent 500, 360 et 50mg/Kg de l'extrait méthanolique, de l'extrait aqueux et de l'indométacine (anti-inflammatoire standard) respectivement par voie orale une heure avant l'induction de l'œdème. Alors que les souris du groupe témoin reçoivent 0,2 ml d'une solution de NaCl 0.9 %.

L'œdème de l'oreille est induit par l'application locale de 30 µl de xylène sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris des quatre groupes à l'aide d'une micropipette. L'épaisseur de l'oreille est mesurée avant et une demi-heure après l'induction de l'inflammation par un pied à coulisse digital (Delaporte *et al.*, 2004). La différence de l'épaisseur avant et après l'application du xylène est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = (\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ traité} / \Delta \text{ Témoin}) \times 100$$

2.2.2. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris

Pour évaluer l'effet anti-œdémateux du traitement local par l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *Malva parviflora*, l'œdème de l'oreille est induit par l'huile de croton, selon la méthode de Manga et ses collaborateurs (2004). Pour chacune des souris des quatre

groupes utilisés dans ce test, 15µl d'une solution acétone-eau (1:1) contenant 80 µg d'huile de Croton sont appliqués localement sur la face interne de l'oreille droite à l'aide d'une micropipette. Les groupes de souris reçoivent localement 2 mg, 2 mg ou 0,5 mg par oreille de l'extrait méthanolique, l'extrait aqueux et de l'indométacine respectivement, simultanément avec l'agent phlogogénique. Les souris du groupe témoin reçoivent uniquement la solution de l'huile de croton.

L'épaisseur de l'oreille est mesurée par un pied à coulisse digital (Delaporte *et al.*, 2004) avant le traitement et six heures après l'induction de l'inflammation. La différence de l'épaisseur avant et après l'application de l'huile de croton est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule précédente.

2.2.3. Perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris

L'effet de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *Malva parviflora* sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris a été évalué selon la méthode de Kou et ses collaborateurs (2006). Quatre groupes de souris sont utilisés. Les souris des groupes traités reçoivent 500 mg/Kg d'extrait méthanolique, 360 mg/Kg d'extrait aqueux, et 50 mg/Kg de l'anti-inflammatoire standard par voie orale. Les souris du groupe témoin reçoivent 0,2 ml d'une solution de NaCl 0,9 %. Une heure après, les souris reçoivent une injection intraveineuse de 10 ml/Kg d'une solution de bleu d'Evans 1%, suivie d'une injection intra péritonéal de 10 ml/Kg d'acide acétique 0,7%. Trente minutes après, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. L'exsudat péritonéal est récupéré par lavage de la cavité péritonéale par 3 ml d'une solution saline normale. La solution de lavage est ensuite centrifugée. L'absorbance du surnagent est mesurée à 610 nm contre une solution NaCl 0,9% qui est notre blanc. La concentration du bleu d'Evans dans la solution de lavage de la cavité péritonéale est ensuite déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage.

La concentration du bleu d'Evans exprime la perméabilité vasculaire. Le pourcentage d'inhibition de la perméabilité vasculaire est calculé selon la formule suivante :

% inhibition = [Concentration (Témoin) – Concentration (Traité) / Concentration (Témoin)] x 100

2.3. Activité antioxydante *in vitro*

2.3.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux de *Malva parviflora* a été évaluée vis-à-vis du Diphényl picryl-hydrazyl (DPPH) comme un radical libre relativement stable selon le protocole décrit par Mansouri *et al* (2005). Brièvement, La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. Un volume de 25 µL des solutions d'extraits et de l'antioxydant standard, le hydroxytoluène butylé (BHT) sont ajoutés à 975 µL de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm contre un blanc de méthanol. Le contrôle contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égale de méthanol. L'activité antiradicalaire est déterminée selon l'équation suivante:

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{517} \text{ test}] / \text{Abs}_{517} \text{ contrôle} \times 100$$

Deux autres paramètres sont introduits pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire; la concentration effective à 50% (EC₅₀) et le pouvoir antiradicalaire (APR) :

- L'EC₅₀ prend en considération la concentration de DPPH présente dans le milieu réactionnel
[concentration effective à 50%, EC₅₀ = (IC₅₀/mg de DPPH/ml)]
- APR est inversement proportionnel à l'EC₅₀ (APR = 1/EC₅₀) (P rakash *et al.*, 2007).

Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 13,6 et 340 µg pour l'extrait méthanolique, entre 9 et 225 µg pour l'extrait aqueux, et entre 21 et 151,25 µg/ml pour l'antioxydant standard (BHT).

2.3.2. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des extraits des feuilles de *Malva parviflora* est mesurée selon la méthode de Le et ses collaborateurs (2007). Des solutions d'extraits et de l'antioxydant standard (500 µl) sont initialement mélangés avec 100 µl de FeCl₂ (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 µl de méthanol. Après 5min, 100 µl de Ferrozine (5 mM dans le méthanol) sont additionnées au

milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laisser pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la complexation du fer résiduelle et la formation d'un chromophore rouge (Fe(II)-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm. Le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égale de méthanol.

Les lectures sont effectuées à 562 nm contre un blanc de méthanol. L'effet séquestrant des échantillons *vis-à-vis* du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Chélation} = [(Abs_{562} \text{ contrôle} - Abs_{562} \text{ test}) / Abs_{562} \text{ contrôle}] \times 100$$

Pour une caractérisation meilleure de l'efficacité des extraits, leur activité chélatrice est exprimée en mg d'équivalent d'EDTA/g d'extrait.

Les extraits ont été utilisés à des concentrations allant de 0,14 à 1,42 mg/ml pour l'extrait méthanolique, 4 à 146,8 µg/ml pour l'extrait aqueux et de 0,23 à 23µg/ml pour chélateur standard L'EDTA.

2.4. Activité antioxydante *in vivo*: Capacité antioxydante totale du sang

Le potentiel global de défense antioxydante a été mesuré selon le protocole décrit par Alonso-Alvarez et ses collaborateurs (2004). Des souris femelle sont répartie en cinq groupes de 9 animaux chacun. Deux groupes sont gavées quotidiennement par 300 et 600 mg /kg d'extrait méthanolique des feuilles de *Malva parviflora*. Deux autres groupes sont gavés quotidiennement par 180 et 360 mg /kg de l'extrait aqueux des feuilles de *Malva parviflora*. Les souris du groupe témoin reçoivent le même volume d'une solution saline normale.

Après trois semaines de traitement, le sang est prélevé par une ponction cardiaque. Au cours de chaque prélèvement, une quantité d'environ 0,5 ml de sang est recueilli dans un tube eppendorff. Un aliquote de 100 µl de sang totale est transféré immédiatement vers un autre tube contenant 2,4 ml de tampon (pH 7,4) afin d'obtenir une dilution de 4%. Des aliquotes de 80 µl de chacune des solutions sanguines obtenues précédemment sont déposés dans des puit de

microplaque et exposés au radicaux produits par la décomposition thermique à 40 C° de 136 µl de 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl (AAPH) (150 mM).

La cinétique de disparition progressive des hématies est suivie par la mesure de la diminution de l'absorbance à 630 nm (Girard *et al.*, 2006) par un lecteur de microplaques (ELX 800 de Bio-TEK instruments). La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (Temps de demi Hémolyse ; TH₅₀) qui est déterminée à partir des sigmoïdes de la cinétique d'hémolyse établis par le logiciel (Grap Pad. Prism. V 5.00)

2.5. Analyses statistique

Les résultats des tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne ± SD et moyenne ± SEM respectivement. Les valeurs IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = *f* (concentration)]. Les sigmoïdes de la cinétique d'hémolyse ainsi que la détermination du TH₅₀ sont effectués par un logiciel (Graph Pad. Prism. V 5.00). La différence entre le contrôle et les différents tests est déterminée par le test ANOVA univariée suivi du test de Dunnett pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ($p < 0.05$).

RESULTATS

1. Préparation des extraits des feuilles de *Malva parviflora*

Le rendement de l'extraction méthanolique est de 17%, tandis que celui de l'extraction aqueuse est de 19%.

2. Activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits des feuilles de *Malva parviflora*

2.1. Effet des extraits des feuilles de *Malva parviflora* sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris

L'effet anti-œdémateux de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux a été investigué en utilisant le modèle de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. Les souris du groupe témoin ayant reçu localement 30 μ l de xylène sur la face interne de l'oreille droite ont développé au bout d'une demi-heure un œdème caractérisé par une augmentation de l'épaisseur de l'oreille de $178,33 \pm 8,72 \mu\text{m}$.

L'administration de 50 mg/Kg de l'indométacine par voie orale une heure avant l'induction de l'œdème provoque une diminution significative ($p < 0.001$) de l'œdème de l'oreille comparé à celui des souris du groupe témoin. La différence de l'épaisseur de l'oreille avant et une demi-heure après l'induction de l'inflammation est de $100 \pm 5,77 \mu\text{m}$, ce qui correspond à une inhibition de 44% (figure 7).

Le traitement par 500 mg/Kg d'extrait méthanolique des feuilles de *Malva parviflora* par voie orale induit une atténuation significative ($p < 0.001$) de l'inflammation par rapport aux souris du groupe témoin. Un œdème de $105 \pm 5,00 \mu\text{m}$ est observé et l'inhibition est de 41%. Cette inhibition est similaire à celle de l'indométacine (figure 7).

D'une manière similaire, le traitement par 360 mg/Kg de l'extrait aqueux provoque une réduction significative ($p < 0.001$) de l'inflammation, avec un œdème de $114 \pm 5,47 \mu\text{m}$ qui correspond à une inhibition de 36%. Cette inhibition est également similaire à celle de l'indométacine (figure 7).

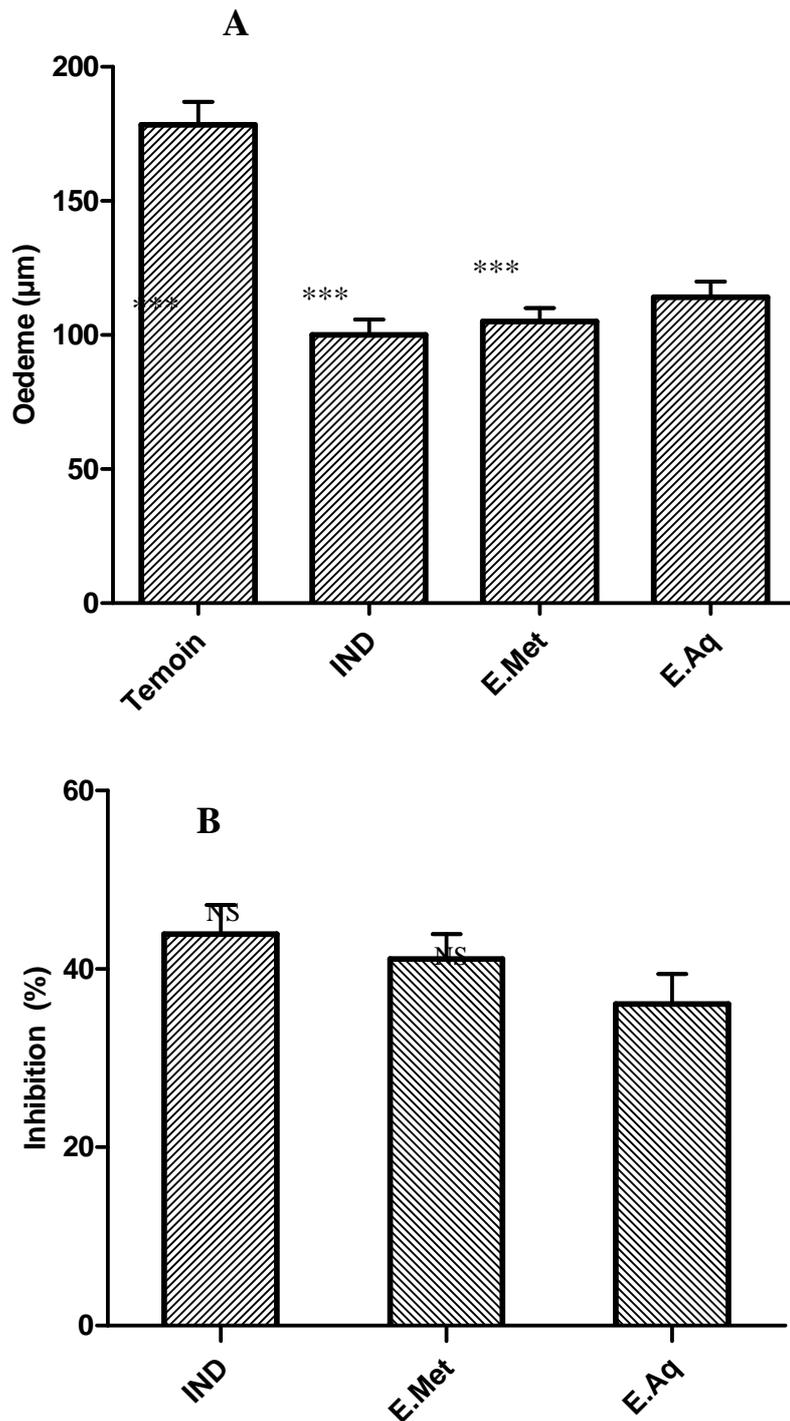


Figure 7 : Effet des extraits des feuilles de malva parviflora sur l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris. L'œdème est induit par l'application locale de 30 µl de xylène sur la face interne de l'oreille droite. Les groupes de souris sont prétraités oralement par l'indométacine (IND), l'extrait méthanolique (E.Met), ou par l'extrait aqueux (E.Aq) à des doses de 50, 500 et 360 mg/Kg respectivement. Le groupe de souris témoin reçoit du NaCl 0.9%. **A :** Différence de l'épaisseur avant et une demi heure après l'induction de l'œdème. La comparaison est faite par rapport au groupe témoin. **B :** Pourcentage d'inhibition de l'œdème. La comparaison est faite par rapport à l'indométacine. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM (n = 6). *** : p < 0.001, NS : non significatif. (ANOVA univarié suivie du test de Dunnett).

2.2. Effet des extraits des feuilles de *Malva parviflora* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris

L'effet anti-œdémateux du traitement local par l'extrait méthanolique et par l'extrait aqueux de *Malva parviflora* a été évalué en utilisant le modèle de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris qui est un modèle d'inflammation aiguë.

Les souris du groupe témoin ayant reçu uniquement la solution d'huile de croton ont développé au bout de six heures un œdème au niveau de l'oreille droite caractérisé par une augmentation de l'épaisseur de $217,5 \pm 8,81 \mu\text{m}$.

Chez les souris du groupe traité localement par 0,5 mg/oreille d'indométacine, on a constaté une réduction significative ($p < 0.001$) de l'inflammation comparée à celle développée par les souris du groupe témoin. L'augmentation de l'épaisseur six heures après l'induction de l'inflammation est de $116,25 \pm 6,25 \mu\text{m}$, ce qui correspond à une inhibition de 47% (figure 8).

Le traitement par 2 mg/oreille de l'extrait méthanolique a induit une atténuation significative ($p < 0.001$) de l'inflammation par rapport aux souris du groupe témoin. L'augmentation de l'épaisseur est de $93,75 \pm 4,60 \mu\text{m}$. L'inhibition est donc de 57%. Ce pourcentage d'inhibition est significativement ($p < 0.01$) supérieur à celui obtenu avec l'indométacine (figure 8).

Une diminution très légère et non significative de l'œdème est observée chez les souris du groupe traité par 2 mg/Kg de l'extrait aqueux par rapport aux souris du groupe témoin. Cette diminution correspond à 5% d'inhibition, ce qui est significativement ($p < 0.001$) inférieure à celle de l'indométacine (figure 8).

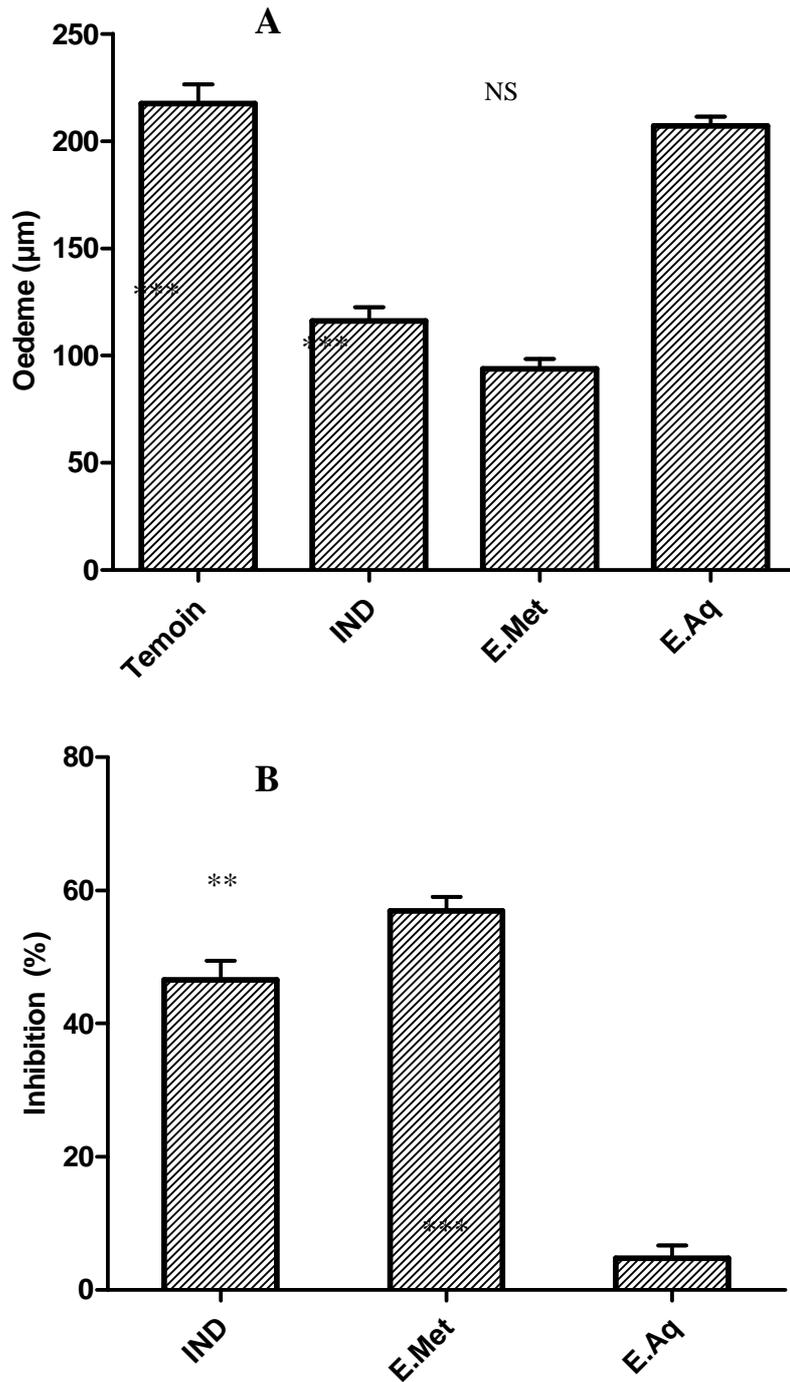


Figure 8 : Effet des extraits des feuilles de malva parviflora sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. L'œdème est induit par application locale de 80 µg de l'huile de croton sur la face interne de l'oreille droite. Les groupes de souris sont traités localement par l'anti-inflammatoire standard ; l'indométacine (IND), par l'extrait méthanolique (E.Met), ou par l'extrait aqueux (E.Aq) à des doses de 0,5 ; 2 et 2 mg/oreille respectivement. Le groupe de souris témoin reçoit uniquement la solution de l'huile de croton. **A** : Différence de l'épaisseur avant et six heures après l'induction de l'œdème. La comparaison est faite par rapport à celle du groupe témoin. **B** : Pourcentage d'inhibition de l'œdème. La comparaison est faite par rapport à l'indométacine. Les valeurs représentent les moyennes ± SEM (n =7-8). *** : p < 0.001, ** : p < 0.01, NS : non significatif (ANOVA univarié suivie du test de Dunnett).

2.3. Effet des extraits des feuilles de *Malva parviflora* sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris

L'effet de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux des feuilles de *Malva parviflora* sur la perméabilité vasculaire a été investigué sur des souris en utilisant le modèle de la perméabilité vasculaire induite au niveau de la cavité péritonéale par l'acide acétique. Une perméabilité vasculaire importante est observée chez les souris du groupe témoin. En effet, une concentration de bleu d'Evans de $30,00 \pm 0,94 \mu\text{g/ml}$ dans la solution de lavage de l'exsudat péritonéal est enregistrée trente minutes après l'induction de l'inflammation (figure 9).

Les résultats obtenus avec les trois groupes traités par l'indométacine, l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux une heure avant l'induction de l'inflammation montrent que chacun des traitements induit une inhibition significative ($p < 0.001$) de la perméabilité vasculaire au niveau de la cavité péritonéale (figure 9).

Le traitement par 50 mg/kg d'indométacine diminue la concentration du bleu d'Evans dans l'exsudat péritonéale qui est de $16,84 \pm 0,58 \mu\text{g/ml}$. Comparée à celle du groupe témoin, cette concentration est significativement plus faible ($p < 0.001$) et correspond à une inhibition de 44% de la perméabilité vasculaire (figure 9)

Le traitement par 500 mg/kg d'extrait méthanolique par voie orale provoque une inhibition de 36% de la perméabilité vasculaire au niveau de la cavité péritonéale qui est statistiquement similaire à celle provoquée par l'indométacine. En effet, la concentration du bleu d'Evans dans l'exsudat péritonéale est de $19,31 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$ Cette valeur est également significativement ($p < 0.001$) inférieure à celle du groupe témoin (figure 9).

D'une manière similaire une réduction significative de la perméabilité vasculaire de 40% est observée chez les souris du groupe traité par 360 mg/kg de l'extrait Aqueux. Cette inhibition est également statistiquement similaire à celle de l'indométacine. La concentration du bleu d'Evans dans l'exsudat péritonéale est de $17,94 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$. Cette valeur est significativement ($p < 0.001$) inférieure à celle du groupe témoin (figure 9).

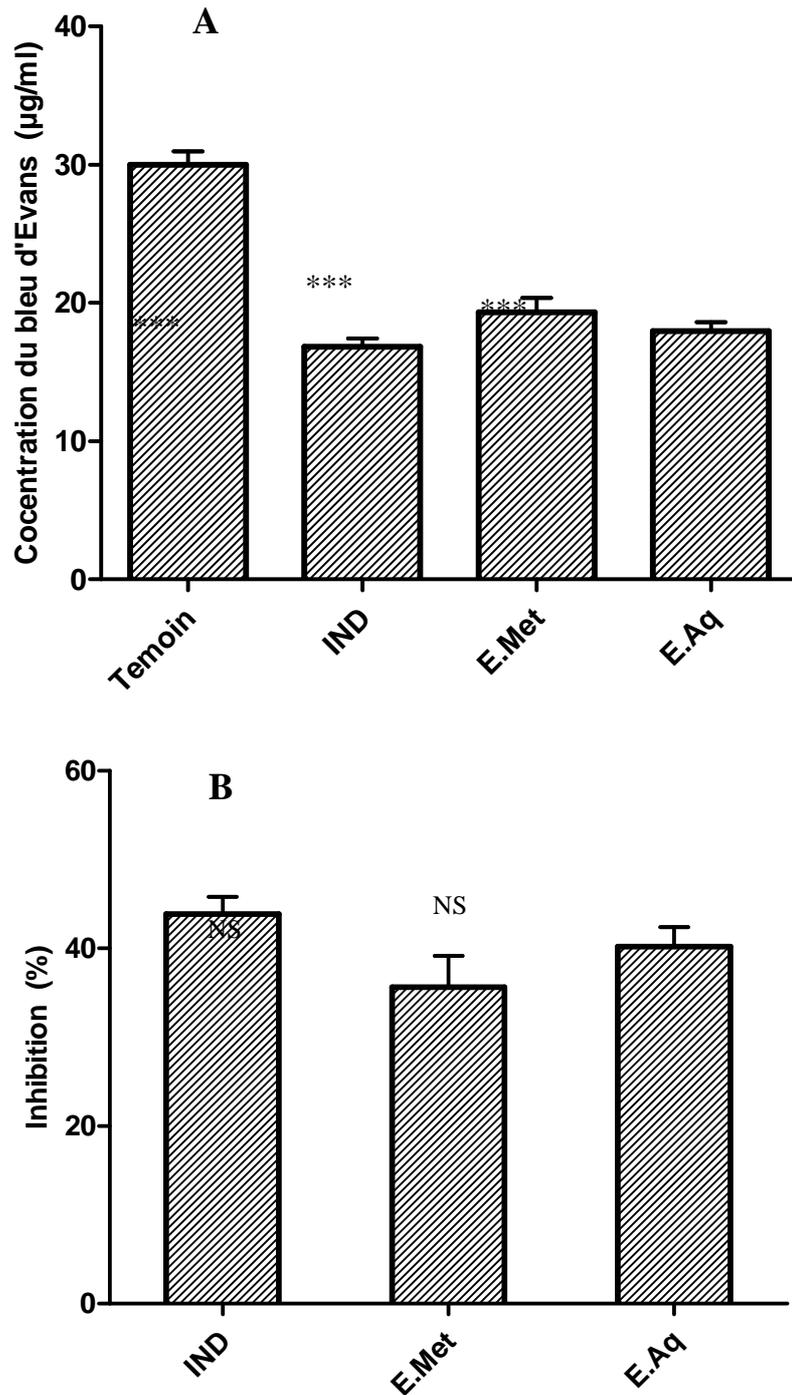


Figure 9 : Effet des extraits des feuilles de malva parviflora sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris. La perméabilité vasculaire est induite par injection intrapéritonéale de 10 ml/Kg d'acide acétique 0,7%. Les groupes de souris sont prétraités oralement par l'indométacine (IND), l'extrait méthanolique (E.Met), ou par l'extrait aqueux (E.Aq) à des doses de 50, 500 et 360 mg/Kg respectivement. Le groupe de souris témoin reçoit uniquement du NaCl 0.9%. **A** : Concentration du bleu d'Evans dans l'exsudat péritonéale. La comparaison est faite par rapport à celle du groupe témoin. **B** : Pourcentage d'inhibition de la perméabilité vasculaire. La comparaison est faite par rapport à l'indométacine. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n=6). *** : $p < 0.001$, NS : non significatif (ANOVA univarié suivie du test de Dunnett).

3. Activité antioxydante des extraits des feuilles de *Malva parviflora*

3.1. Activité antioxydante *in vitro* des extraits des feuilles de *Malva parviflora*

3.1.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *Malva parviflora* a été évaluée dans la présente étude. Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les deux extraits étudiés possèdent une activité antiradicalaire concentration dépendante (Figure 10).

Une inhibition maximale de 94% du radical DPPH est obtenue avec la concentration de 128 µg/ml de BHT. L'extrait méthanolique exerce une inhibition maximale de 89% à une concentration de 231 µg/ml. Alors que l'extrait aqueux montre une inhibition maximale de 85% à une concentration de 171 µg/ml.

Le tableau ci-dessous montre les concentration inhibitrice à 50% (IC₅₀) de chacun des différents extraits et du BHT, ainsi que la concentration effective à 50%, (EC₅₀) et le pouvoir antiradicalaire (PAR).

Tableau 10. Activité antiradicalaire des extraits des feuilles de *Malva parviflora*. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD.

	IC ₅₀ (µg /ml)	EC ₅₀ (µg /µg DPPH)	PAR
BHT	43,48 ± 0,58	1,85 ± 0,02	0,538 ± 0,007
E.Met	89,03 ± 2,65	3,80 ± 0,11	0,262 ± 0,007
E.Aq	76,67 ± 0,29	3,27 ± 0,01	0,305 ± 0,001

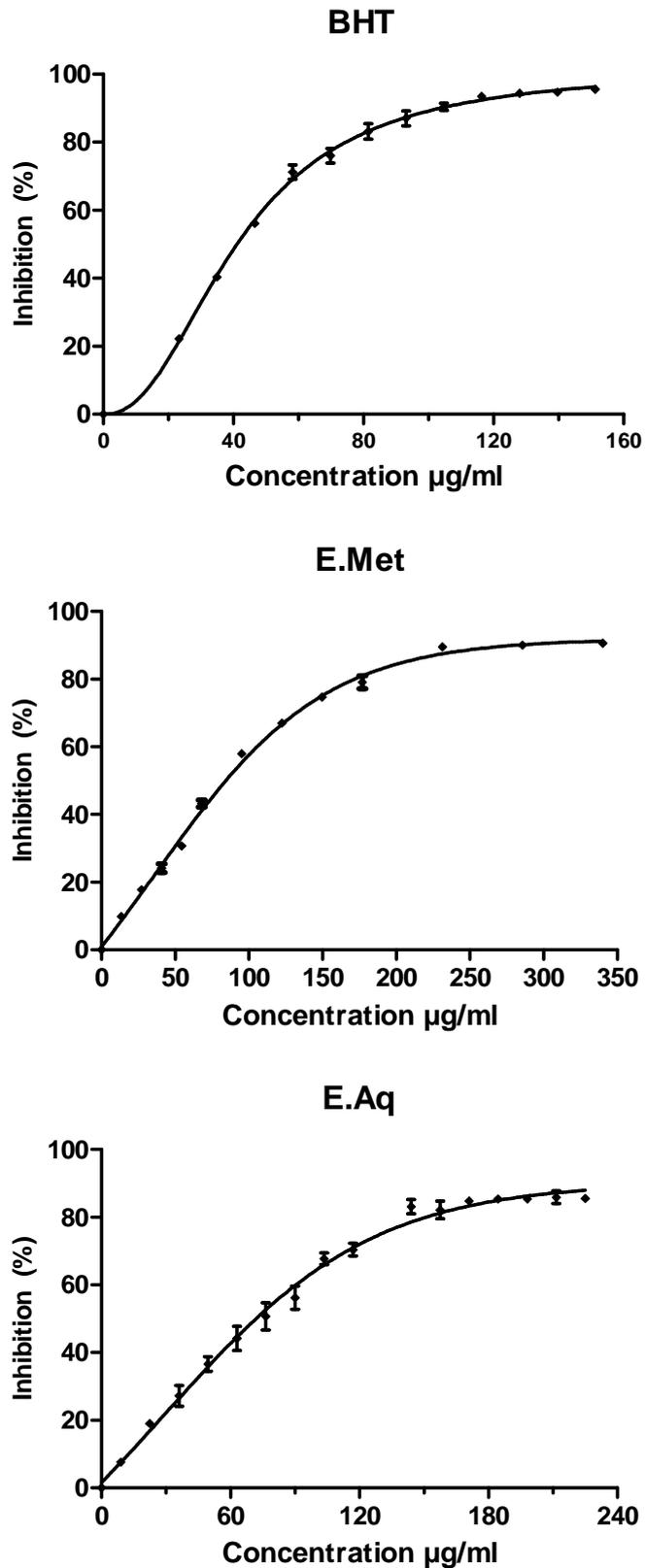


Figure 10 : Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique (E.Met) et de l'extrait aqueux (E.Aq) des feuilles de *Malva parviflora* et de l'anti-oxydant standard BHT vis-à-vis du radical DPPH. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

3.1.2. Chélation du fer ferreux

La chélation du fer ferreux par l'extrait méthanolique et aqueux de *Malva parviflora* a été évaluée en utilisant la ferrozine comme détecteur du fer libre. Celle-ci se complexe avec le fer résiduel dans le milieu réactionnel et forme un chromophore rouge (Fe(II)-Ferrozine) ayant un maximum d'absorption à 562 nm

Les absorbances mesurés à 562 nm montrent que les deux extraits de *Malva parviflora* possèdent une activité chélatrice vis-à-vis de l'ion ferreux (Figure 11).

Une chélation maximale de 97% du fer ferreux est obtenue avec la concentration de 17,5 µg/ml d'EDTA. L'extrait méthanolique exerce une chélation maximale de 83% à une concentration de 710,22 µg/ml. Alors que l'extrait aqueux montre une chélation maximale de 92% à une concentration de 120 µg/ml.

Le tableau ci-dessous montre les valeurs d' IC₅₀ obtenues avec l'EDTA et les deux extraits de *Malva parviflora* ainsi que leur activité chélatrice exprimée en mg d'équivalent d'EDTA/g d'extrait.

Tableau 11. Activité chélatrice des extraits des feuilles de *Malva parviflora*. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD.

	IC ₅₀ (µg/ml)	Activité chélatrice (mg E-EDTA/g d'extrait)
EDTA	6,87 ± 0,131	---
E.Met	346,71 ± 7,25	19,82 ± 0,41
E.Aq	42,26 ± 0,61	162,58 ± 2,36

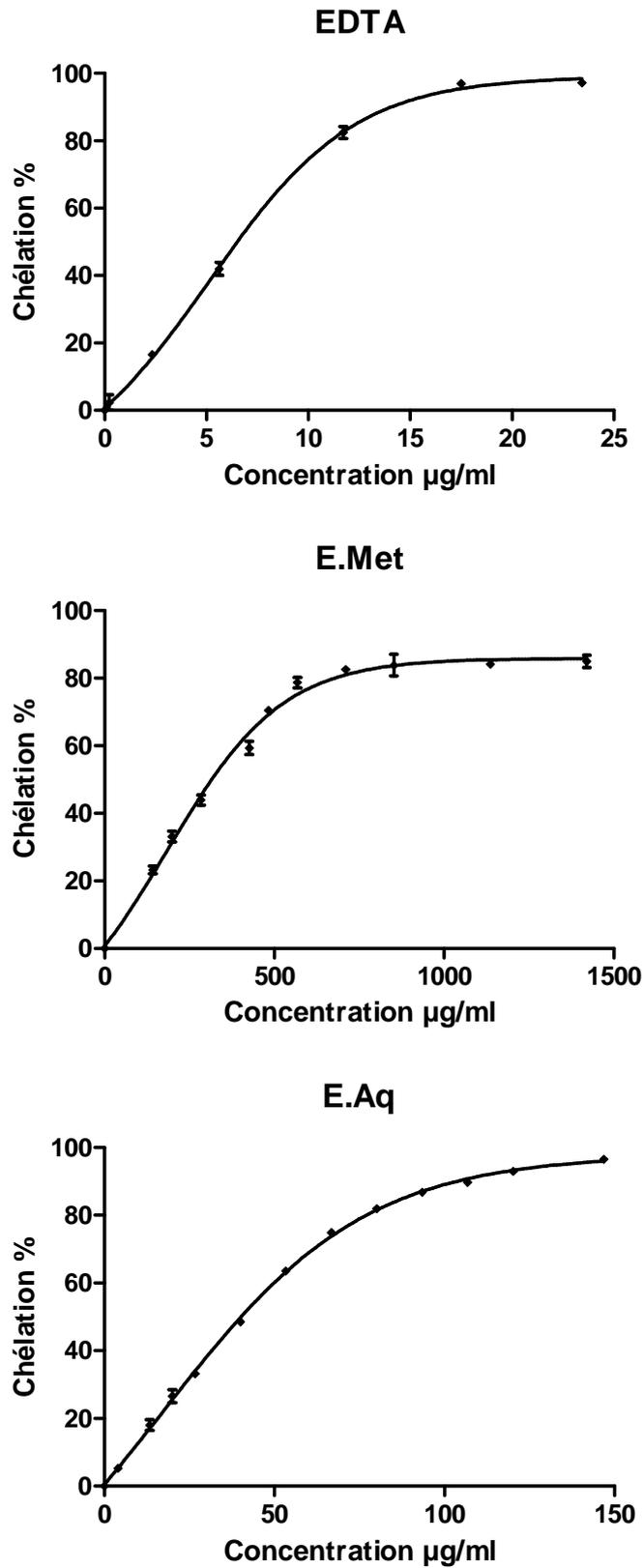


Figure 11 : Activité chélatrice des extraits des feuilles de *Malva parviflora* et de l'EDTA vis-à-vis du fer ferreux, exprimé en pourcentage de chélation. Extrait méthanolique (E.Met), extrait aqueux (E.Aq). Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD.

3.2. Effet des extraits des feuilles de *Malva parviflora* sur la capacité antioxydante totale du sang *in vivo*

L'effet antioxydant de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux des feuilles de *Malva parviflora* sur l'état de défense des souris vis-à-vis des radicaux libres est évalué dans cette étude. Des échantillons du sang de souris sont soumis à l'agression radicalaire par le 2,2'-azo-bis (2-amidinopropane) HCl (AAPH). Les hématies sont lysées sous l'effet des radicaux issus de la décomposition thermique du AAPH. À partir de la cinétique de disparition progressive des hématies obtenues par la mesure de la diminution de l'absorbance à 630 nm, il paraît que le traitement par l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux entraîne un retardement de la disparition des hématies qui apparaît dans un décalage des sigmoïdes vers la droite (figure 12). Effectivement les valeurs des Temps de demi Hémolysé (TH₅₀) obtenues révèlent un prolongement de ce temps chez tous les groupes traités par rapport au groupe témoin (Figure 13).

Le traitement par l'extrait méthanolique à une dose de 300 mg/kg provoque une élévation du TH₅₀ obtenue (TH₅₀ = 100,00 ± 2,06 min), mais qui est statistiquement non significative par rapport au groupe témoin. Par contre, l'administration d'une dose plus élevée (600 mg/kg) a provoqué un retardement significatif (p < 0,05) de la disparition des hématies avec une TH₅₀ de 103,96 ± 1,43 min (figure 13).

Pour les souris du groupe traités par 180 mg/kg de l'extrait aqueux, l'augmentation du TH₅₀ (100,16 ± 1,70 min) reste statistiquement non significative par rapport au groupe témoin (TH₅₀ = 96,24 ± 1,78 min). Tandis que le traitement par une dose plus élevée (360 mg/kg) d'extrait aqueux engendre un retardement très significatif (p < 0,001) de la disparition des hématies (TH₅₀ = 107,07 ± 1,92 min) (figure 13).

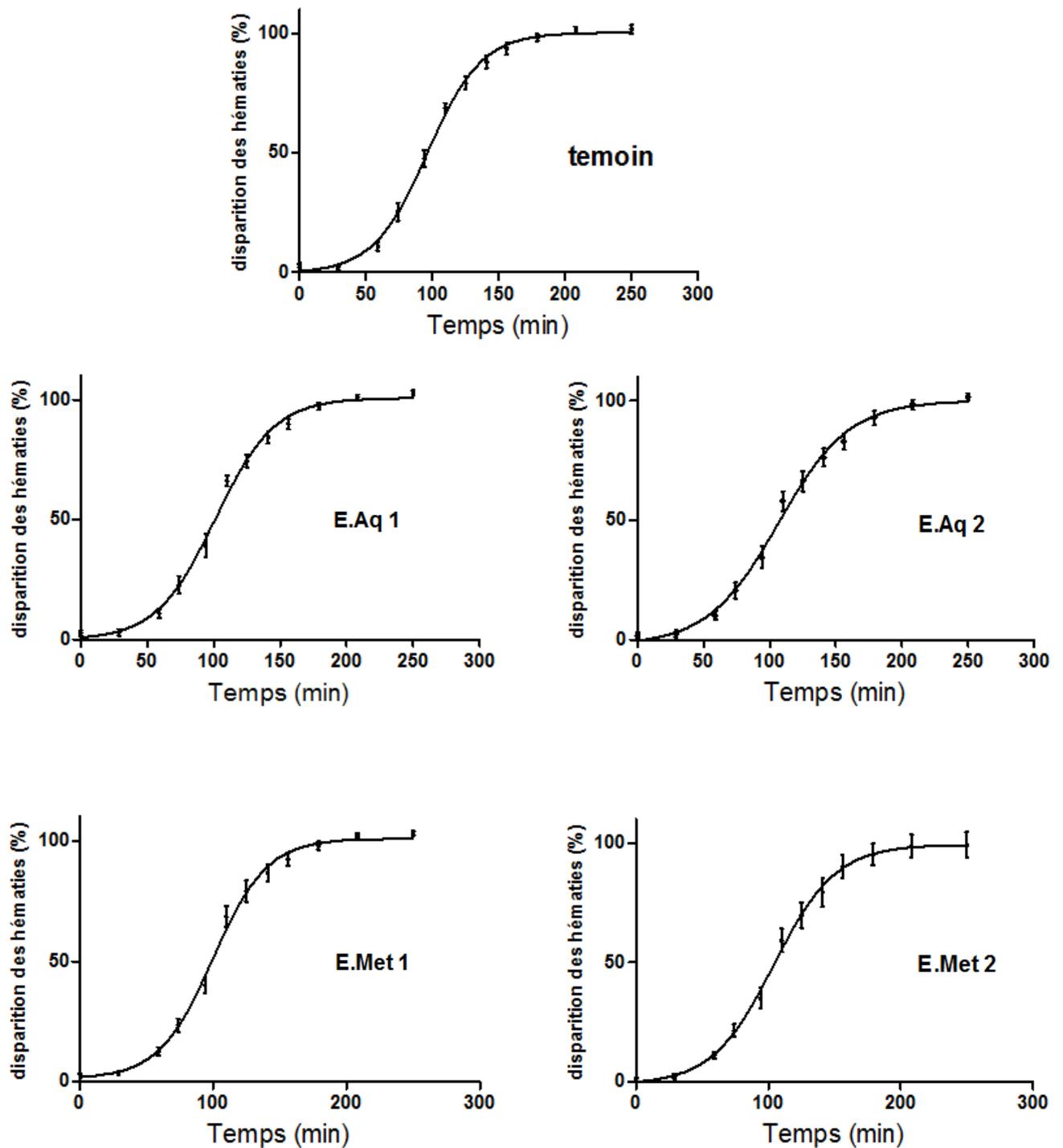


Figure 12 : Effet des extraits des feuilles de malva parviflora sur la cinétique de la lyse érythrocytaire. Les groupes sont gavés pendant trois semaines par ; une solution saline normale (Témoin), par l'extrait méthanolique 300 et 600 mg/kg respectivement (E.Met 1) et (E.Met 2), et par l'extrait aqueux 180 et 360 mg/kg respectivement (E.Aq 1) et (E.Aq 2). Le sang est prélevé via une ponction cardiaque puis dilué à 4%. Des aliquotes de 80 μ l sont exposés au radical produit par la décomposition de 136 μ l de AAPH (150 mM) à 40 C°. La cinétique de disparition progressive des hématies est suivie par la mesure de la diminution de l'absorbance à 630 nm. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 7-9).

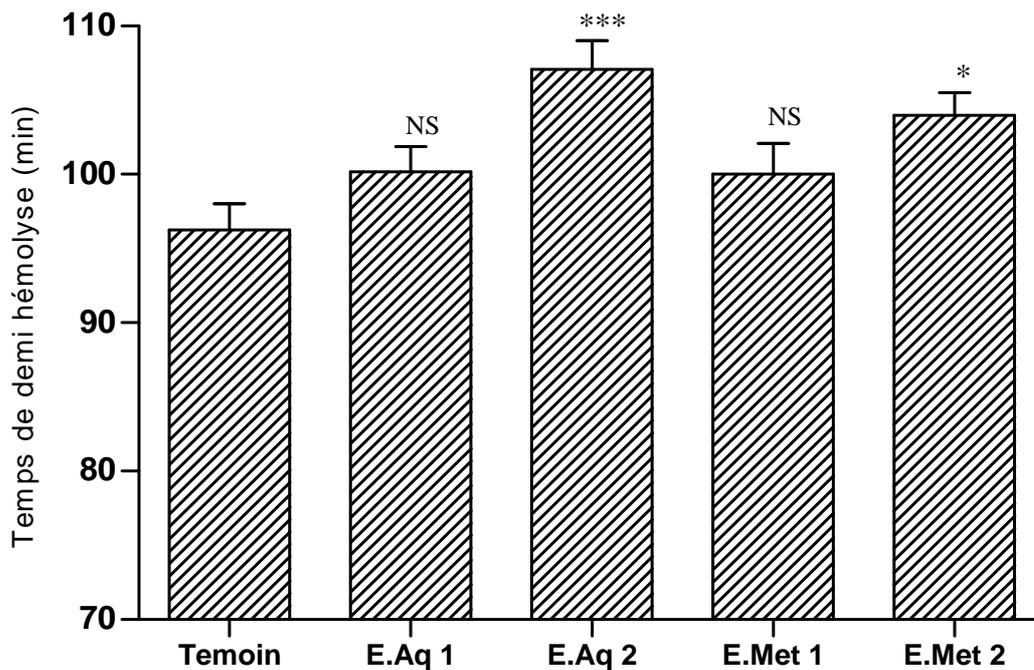


Figure 13 : Effet des extraits des feuilles de malva parviflora sur le temps de demi hémolyse (TH₅₀). Les conditions expérimentales sont les même que celle de la figure précédente. Groupes traités par l'extrait méthanolique 300 et 600 mg/kg respectivement (E.Met 1) et (E.Met 2), groupes traités par l'extrait aqueux 180 et 360 mg/kg respectivement (E.Aq 1) et (E.Aq 2). La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (TH₅₀) qui est déterminée à partir des sigmoïdes de la cinétique d'hémolyse établis par le logiciel (Grap Pad. Prism. V 5.00). Les valeurs représentent les moyennes ± SEM (n = 7-9). Les comparaisons sont effectuées par rapport au groupe témoin ; **** : p < 0.001, * : P < 0.05, NS : non significatif (ANOVA univarié suivie du test de Dunnett).

DISCUSSION

1. Préparation des extraits des feuilles de *Malva parviflora*

L'extrait méthanolique des feuilles de *Malva parviflora* a été préparé dans la présente étude par macération de la poudre de feuilles dans le mélange méthanol/eau. L'utilisation de ce mélange hydroalcoolique a pour bute d'extraire les composés polaires ainsi que les composés de moyenne et de faible polarité. L'aptitude du méthanol d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires facilite l'extraction d'un plus grand nombre de composés (Seidel, 2005). L'utilisation du méthanol permet également de prévenir la croissance microbienne au cours de la macération (Seidel, 2005). De même, le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'obtenir le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

L'extrait aqueux a été préparé selon la méthode traditionnelle qui consiste à faire bouillir les feuilles pendant 20 minutes (Ferreira *et al.*, 2006). La poudre de feuilles a été utilisée au lieu des feuilles entières pour permettre une extraction plus efficace. Toutefois l'eau n'est pas le solvant idéal pour plusieurs constituants bioactifs des plantes. Elle permet d'extraire préférentiellement les composés polaires. A température élevée, l'eau peut aussi extraire quelques composés amphiphile (Jones et Kinghon, 2006).

Le rendement de l'extraction hydroalcoolique (17%), est relativement supérieur à celui (14%) obtenu par Afolayan et ses collaborateurs (2008). Le rendement de l'extraction aqueuse (19%) est relativement supérieur à celui obtenue avec l'extraction hydroalcoolique.

2. Activité anti-inflammatoire *in vivo* des extraits des feuilles de *Malva parviflora*

2.1. Effet des extraits des feuilles de *Malva parviflora* sur l'œdème de l'oreille

Deux modèle de l'œdème de l'oreille ont été utilisés dans la présente étude. Le premier est induit par le xylène et le deuxième par l'huile de croton.

L'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris qui est un modèle d'inflammation aiguë, a été utilisé pour évaluer l'effet anti-œdémateux de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux des feuilles de *Malva parviflora*. L'œdème de l'oreille induit par le xylène est un modèle expérimental reproductible et concède une bonne valeur prédictive pour le criblage des agents anti-inflammatoires (Lua *et al.*, 2006).

L'application du xylène sur l'oreille induit une accumulation de liquide conduisant à la formation d'un œdème qui est caractéristique de l'inflammation aiguë (Okoli *et al.*, 2007). L'épaisseur de l'œdème atteint son maximum 30 minutes après l'application du xylène (Lua *et al.*, 2006).

La différence de l'épaisseur de l'oreille des souris avant et une demi heure après l'application locale du xylène a été exploitée dans la présente étude pour évaluer l'effet anti-œdémateux de l'extrait méthanolique et aqueux de *Malva parviflora*.

Le mécanisme moléculaire et cellulaire par le quel le xylène induit l'inflammation met en jeu les neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine qui suite à une stimulation, libèrent un nombre de médiateurs qui peuvent initier la réaction inflammatoire (Rotelli *et al.*, 2003). Ce phénomène est connu sous le nom de l'inflammation neurogénique. La substance P et le peptide lié au gène de la calcitonine sont les principaux initiateurs de l'inflammation neurogénique. Ils induisent une vasodilatation et une exsudation plasmatique en agissant sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins et les cellules endothéliales (Rotelli *et al.*, 2003), comme ils peuvent activer directement les mastocytes et les autres cellules immunitaires. Il est également admis que les neurones sensoriels contiennent des cyclooxygénase capables de synthétiser les prostaglandines pro-inflammatoires (Richardson et Vasko, 2003).

Le prétraitement des souris par l'indométacine par voie orale réduit significativement le développement de l'œdème avec une inhibition de 44%. Li et ses collaborateurs (2008) ont rapporté un effet relativement similaire (51%). Le mécanisme d'action de l'indométacine sur l'inflammation est basé sur l'inhibition de la synthèse de prostaglandines pro-inflammatoires.

D'une manière similaire, le prétraitement des souris par l'extrait méthanolique et aqueux entraîne une inhibition significative du développement de l'œdème. Cette inhibition est

statistiquement similaire à celle exercée par l'anti-inflammatoire standard. Cette inhibition peut être due à la réduction de la libération de la substance P ou à l'antagonisation de son action (Zhou *et al.*, 2008).

D'autres mécanismes peuvent expliquer l'effet anti-inflammatoire montré par les deux extraits testés de *Malva parviflora*. Les travaux de Shale et ses collaborateurs (1999), rapportent que les extraits aqueux, méthanolique et hexanique des feuilles de *Malva parviflora* inhibent significativement la synthèse des prostaglandines *in vitro*.

Dans une autre étude, Shale et ses collaborateurs (2005) ont rapporté que des fractions de l'extrait dichlorométhanique possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis de la cyclooxygénase 2 responsable de la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires. D'une autre part, Afolayan et ses collaborateurs (2008) ont rapporté un contenu relativement élevé de l'extrait méthanolique de *Malva parviflora* en flavonoïdes, sachant que le rôle des flavonoïdes dans l'inhibition de l'activité de la COX 2 ainsi que sa transcription est bien démontré (O'Leary *et al.*, 2004). Les flavonoïdes agissent aussi sur l'expression des molécules d'adhésion et des cytokines pro-inflammatoires par divers mécanismes incluant l'inhibition de la transcription du facteur nucléaire Kappa-B en inhibant les kinases impliquées dans la transduction du signal (González-Gallego *et al.* 2007).

L'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris qui est aussi un modèle de l'inflammation aiguë, a été utilisé pour évaluer l'effet anti-inflammatoire du traitement local par l'extrait méthanolique et par l'extrait aqueux des feuilles de *Malva parviflora*. Ce modèle expérimental est très utilisé pour le criblage d'anti-inflammatoires synthétiques ou naturels à effet local (Della Loggia et Tubaro, 2007).

L'effet phlogogénique de l'huile de croton est dû au principe actif 12-O-tétradécanoyl phorbol acétate (TPA) qu'elle contient. Le TPA induit une réponse inflammatoire caractérisée par une production importante de médiateurs pro-inflammatoires, une augmentation de la perméabilité vasculaire, un œdème et une infiltration de neutrophiles (Delaporte *et al.*, 2004).

L'épaisseur de l'œdème atteint son maximum 6 heures après l'application de l'huile de croton (Tubaro *et al.*, 1985).

Le mécanisme proposé par Murakawa et Yamaoka (2006) par le quel le TPA contenu dans l'huile de croton induit l'inflammation suggère que celui-ci met en jeu l'activation de la protéine kinase C, la phospholipase A2, la cyclooxygénase et la lipoxigénase avec l'induction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Aquila et ses collaborateurs (2009) suggèrent que le TPA stimule l'expression de la cyclooxygénase 2 et de la NO synthase inductible via l'activation de la protéine kinase C (PKC).

Le traitement local des souris par l'anti-inflammatoire standard, l'indométacine, réduit significativement le développement de l'œdème avec une inhibition de 47%. Cette inhibition est similaire à celle obtenue avec l'huile de croton. Han et ses collaborateurs (2007) ont rapporté des résultats relativement similaires (54%).

L'extrait méthanolique exerce une inhibition significative du développement de l'œdème. Cette inhibition est statistiquement supérieure à celle exercée par l'indométacine. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Conforti et ses collaborateurs (2008) qui ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Malva sylvestris* (une espèce du même genre que *Malva parviflora*) inhibe l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. L'effet anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique des feuilles de *Malva parviflora* est probablement dû à la présence de substances lipophiles capables de traverser la barrière cutanée et douées d'activités anti-inflammatoire (Manga *et al.*, 2004).

Le traitement local des souris par l'extrait aqueux ne conduit à aucune inhibition du développement de l'œdème, ce qui peut être dû au fait que cet extrait ne contient que des substances hydrosolubles qui ne peuvent traverser la barrière cutanée (Seidel, 2005).

Selon Kimces et ses collaborateurs (1993) l'effet anti-inflammatoire observé n'est pas dû à l'inhibition de la cyclooxygénase et de la lipoxigénase car l'utilisation d'inhibiteurs spécifique de ces deux enzymes ne réduit pas l'œdème dans ce modèle expérimental de l'inflammation. Cet effet est probablement dû à la présence de composés doués d'activité antioxydante dans l'extrait méthanolique comme l'on suggéré Conforti et ses collaborateurs (2008), sachant que les espèces

oxygénées réactives produites au cours de l'inflammation par les cellules phagocytaires, et durant le métabolisme de l'acide arachidonique peuvent activer la phospholipase A2 qui a pour rôle de libérer ce dernier à partir des phospholipides membranaires pour qu'il soit transformé par la suite en médiateurs pro-inflammatoires (Geronikaki et Gavalas, 2006). Cette possibilité est soutenue par les résultats de Afolayan et ses collaborateurs (2008) qui ont rapporté un contenu relativement élevé de l'extrait méthanolique de *Malva parviflora* en flavonoides et une activité anti-oxydante remarquable vis-à-vis du radical 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), avec une inhibition comparable à celle de l'anti-oxydant standard, le (BHT). Les effets anti-oxydants observés dans notre étude (effet scavenger du radical DPPH, chélation du fer ferreux) supportent également cette possibilité.

L'effet anti-inflammatoire montré par l'extrait méthanolique des feuilles de *Malva parviflora* peut être également expliqué par l'inhibition de la PKC dont l'implication dans le processus inflammatoire est bien évidente dans ce modèle expérimental (Delaporte *et al.*, 2004).

2.2. Effet des extraits des feuilles de *Malva parviflora* sur la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris

La perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique est un modèle expérimentale typique pour évaluer l'effet des substance naturelles ou synthétiques sur la phase exsudative de l'inflammation aiguë (Okoli *et al.*, 2007).

L'augmentation de la perméabilité vasculaire est un élément essentiel dans la réaction inflammatoire aiguë (Zhou *et al.*, 2007). Dans ce modèle, l'acide acétique administré par voie intrapéritonéale induit une augmentation du contenu péritonéal en sérotonine, histamine et prostaglandines (PGE2 et PGF2). Ceci conduit à une dilatation des artérioles et des veinules (Carey *et al.*, 2008) avec une contraction et une séparation des cellules endothéliales, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire et par conséquent, l'extravasation des protéines plasmatiques vers la cavité péritonéale (Okoli *et al.*, 2007).

Le bleu d'Evans est un colorant vital très utilisé comme marqueur de l'exsudation extravasculaire (Dallal et Chang, 1994 ; Dürmüller *et al.*, 1997). Son injection préalable dans la

circulation sanguine lui permet de se complexer aux protéines plasmatiques (Wilhelm, 1973). De ce fait, la mesure de la concentration du bleu d'Evans dans le liquide de lavage de la cavité péritonéale de souris une demi-heure après l'injection intrapéritonéale de l'acide acétique permet d'évaluer l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

Le prétraitement des souris par l'indométacine, réduit significativement la perméabilité vasculaire avec une inhibition de 44%. Dans une étude menée par Okoli et ses collaborateurs (2007) l'indométacine a montré une inhibition relativement similaire (51%).

L'action de l'indométacine est due à l'inhibition non sélective des cyclooxygénases 1 et 2 (Bidaut-Russel, 2008), dont la deuxième est responsable de la production de prostaglandines (PGE2, PGF2 α) ayant une activité vasodilatatrice confirmée, en plus de l'induction de l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Male, 2007).

Le prétraitement des souris par l'extrait méthanolique et par l'extrait aqueux entraîne une inhibition significative de la perméabilité vasculaire. Cette inhibition est statistiquement similaire à celle exercée par l'indométacine.

La perméabilité vasculaire est derrière l'exsudation plasmatique qui contribue à enrichir le milieu extravasculaire en facteurs destinés à entretenir et à amplifier la réponse inflammatoire (Regnault, 1992). La capacité des deux extraits d'inhiber la perméabilité vasculaire indique qu'ils peuvent moduler l'amplitude de la réaction inflammatoire, ce qui peut expliquer l'effet anti-œdémateux observé dans les deux tests précédents.

Ces résultats suggèrent que les deux extraits testés exercent une activité anti-inflammatoire d'une manière similaire à celle de l'indométacine par l'inhibition de la cyclooxygénase (Carey *et al.*, 2008). Ceci est soutenu par les travaux de Shale et ses collaborateurs (1999 ; 2005) qui ont montré la capacité des extraits de *Malva parviflora* d'inhiber la cyclooxygénase 2, qui est responsable de la production des prostaglandines pro-inflammatoires.

3. Activité anti-oxydante

3.1. Activité anti-oxydante *in vitro* des extraits des feuilles de *Malva parviflora*

Deux tests ont été utilisés pour évaluer l'effet antioxydant des extraits des feuilles de *Malva parviflora* :

D'une part, l'effet piègeur a été évalué en utilisant le test de DPPH qui est un radical libre stable caractérisé par une couleur violette en solution dans le méthanol. Il présente une forte bande d'absorption à 517 nm. L'addition d'un composé donneur de proton (antioxydant) dans une solution de DPPH, conduit à la réduction de ce dernier et à sa décoloration en un composé jaune (Figure 14). Cette décoloration sera directement proportionnelle au nombre de protons captés et peut être suivie par la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel à 517 nm (Mosquera *et al*, 2007). Elle permet d'évaluer le taux d'oxydation du DPPH et fournit donc un moyen pratique pour mesurer le pouvoir anti-oxydant des extraits étudiés.

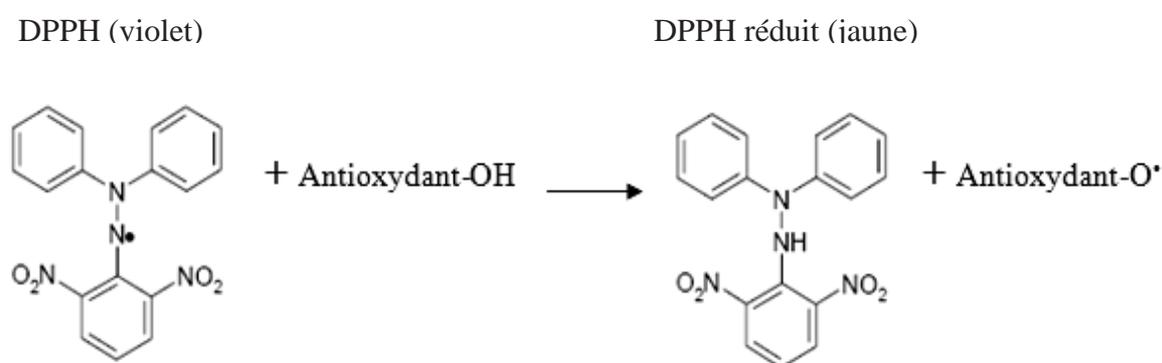


Figure 14 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

Les résultats de la présente étude montrent que les extraits des feuilles de *Malva parviflora* possèdent des effets piègeurs remarquables vis-à-vis du radical DPPH. En effet, les extraits aqueux et méthanolique ont donné des valeurs d'IC₅₀ très faibles de l'ordre de 76 et 89 µg/ml respectivement. Etant donné que le pouvoir antiradicalaire est inversement proportionnel à la concentration inhibitrice à 50%, les extraits aqueux et méthanolique possèdent un très puissant pouvoir antiradicalaire. En comparaison à l'effet de l'antioxydant standard (BHT), ces deux

extraits sont deux fois moins actifs. L'activité des extraits des feuilles de *Malva parviflora* est fort probablement attribuée à la présence des composés phénoliques qui sont connus comme des substances antioxydantes ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Hennebelle *et al.*, 2004).

De nombreux travaux réalisés sur les activités antioxydantes des extraits de plantes ont montré que la capacité antiradicalaire déterminée par le test du DPPH est bien corrélée au contenu en polyphénols totaux présents dans l'échantillon étudié (Mansouri *et al.*, 2005; Beta *et al.*, 2005; Samaniego-Sánchez *et al.*, 2007). Dans une étude phytochimique réalisée sur une autre espèce du genre *Malva* (*Malva sylvestris*), Cutillo et ses collaborateurs (2006) ont montré que cette plante contient plusieurs acides phénoliques dérivés principalement de l'acide benzoïque (acide 4-hydroxybenzoïque, acide 4-methoxybenzoïque, acide 4-hydroxy-3-methoxybenzoïque, acide 2-hydroxybenzoïque, acide 4-hydroxy-2-methoxybenzoïque) et des dérivés de l'acide cinnamic (acide 4-hydroxydihydrocinnamique, 4-hydroxy-3-methoxydihydrocinnamic acide, 4-acide hydroxycinnamique). De même, l'étude réalisée par Wang (2005) a montré que les anthocyanines de *Malva sylvestris* sont de puissants piègeurs de radicaux libres.

Très peu de travaux se sont intéressés à l'activité antioxydante des extraits de *Malva parviflora*. L'étude menée par Afolayan et ses collaborateurs (2008) sur les propriétés antiradicalaires de l'extrait méthanolique des feuilles de *Malva parviflora* vis-à-vis du radical libres ABTS montre que cet extrait piège 94,43% du radical pour une concentration de 0,5 mg/ml.

L'activité antioxydante d'autres espèces du genre *Malva* a été investiguée dans d'autres travaux. Mavi et ses collaborateurs (2004) ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Malva neglecta* inhibe le radical DPPH avec une IC₅₀ de 2,24 mg/ml.

Dans le même contexte, Conforti et ses collaborateurs (2008) ont démontrés que l'extrait hydroalcolique de *Malva sylvestris* présente une activité scavenger du radical DPPH avec une IC₅₀ de l'ordre de 606 µg/ml.

Bien que le test au DPPH est largement utilisé comme une méthode d'évaluation de l'activité antioxydante, ce test n'est pas autant standardisé, ce qui explique la divergence des

résultats obtenus d'un travail à l'autre et minimise la fiabilité de toute comparaison (Scherer et Godoy, 2008).

D'une autre part, l'activité chélatrice du fer ferreux par les extraits méthanolique et aqueux des feuilles de *Malva parviflora* a été évalué en utilisant la ferrozine qui peut former un complexe avec le fer (Fe^{2+} -Ferrozine); chromophore rouge ayant un maximum d'absorption à 562 nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée, ce qui aboutit à une diminution de la couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement (Le *et al*, 2007).

La capacité chélatrice est très importante du fait qu'elle réduit la concentration des métaux de transitions catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de Fenton, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxydes et alcoxydes qui peuvent à leur tour entretenir la réaction de peroxydation lipidique (Elmastaş *et al*, 2006). Il a été rapporté que les agents chélateurs qui forment une liaison de type σ avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique (Suresh-Kumar *et al*, 2008)

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que les deux extraits de *Malva parviflora* possèdent une activité chélatrice dose dépendante en capturant les ions ferreux avant qu'ils soient complexés avec la ferrozine.

En comparaison avec l'EDTA qui est un ligand hexadénate ayant une constante de liaison avec le fer très élevée de l'ordre de $4,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Kolayli *et al.*, 2004) et qui a montré une IC_{50} de $6,87 \pm 0,13 \mu\text{g/ml}$, l'extrait aqueux s'avère 6 fois moins active. Cependant, l'activité montrée par l'extrait méthanolique est plus faible ; presque 8 fois moins active que l'extrait aqueux et 50 fois moins active que l'EDTA.

L'activité chélatrice élevée de l'extrait aqueux par rapport à l'extrait méthanolique peut être due à la présence de composés chélateurs dans l'extrait aqueux. Il est admis que les feuilles des Malvacée sont très riches en mucilage (Bruneton, 1999). Ces derniers sont des polysaccharides

solubles dans l'eau et insolubles dans l'alcool. Ils sont caractérisés par leurs propriétés chélatrices (Watanabe, 2008).

Dans une autre étude, El et Karakaya (2004) ont montré que l'extrait hydroalcoolique des graines de *Malva sylvestris* possède une activité chélatrice considérable vis-à-vis du fer ferreux.

3.2. Activité anti-oxydante *in vivo* des extraits de *malva parviflora*

L'effet du traitement par l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *Malva parviflora* sur l'état de défense globale des souris vis-à-vis des radicaux libres a été évalué par le test de la capacité antioxydante totale. Ce test réalisé sur le sang entier des souris, considère toutes les défenses de l'organisme, étant donné que le sang contient les diverses classes d'antioxydants (Stocker *et al.*, 2003). Ces antioxydants se mobilisent lors d'une attaque radicalaire induite *ex vivo* par l'AAPH pour protéger l'intégrité des érythrocytes présentes dans l'échantillon sanguin et retarder ainsi leur hémolyse. La résistance du sang à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% des érythrocytes (TH₅₀) (Alonso-Alvarez *et al.*, 2004).

Les résultats de la présente étude montrent un prolongement du TH₅₀ chez tous les groupes traités par l'extraits méthanolique et aqueux de *Malva parviflora*, ce qui signifie un accroissement de la résistance du sang à l'attaque radicalaire. Cependant, l'analyse statistique de ces résultats montre que cette augmentation de la résistance du sang chez les souris du groupe traité par 180 mg/kg de l'extrait aqueux et du groupe traité par 300 mg/kg d'extrait méthanolique reste statistiquement non significative par rapport au groupe témoin. Par contre l'administration de doses plus élevées (360 mg/kg extrait aqueux et 600 mg/kg extrait métanolique) entraîne une augmentation plus importante et statistiquement significative de la résistance du sang à l'attaque radicalaire, ce qui révèle que les extraits aqueux et méthanolique de *Malva parviflora* agissent d'une manière dose dépendante sur l'amélioration de la capacité antioxydante totale du sang chez la souris.

Les effets antioxydants des extraits de *Malva parviflora* démontrés auparavant dans notre étude *in vitro* supportent les résultats obtenus *in vivo*. Cependant, le comportement antioxydant de ces extraits contre l'attaque radicalaire du AAPH reste difficile à expliquer car le sang est une

matrice complexe dans laquelle les substances testées pourraient être impliquées dans de nombreuses réactions dans le cytoplasme cellulaire, la membrane cellulaire et/ou au niveau extracellulaire (plasma) (Stocker *et al.*, 2003 ; Djeridane *et al.*, 2007).

En se basant sur les travaux de Wang (2005) qui a montré que les anthocyanines de *Malva sylvestris* sont doués de propriétés inhibitrices considérables vis-à-vis de la peroxydation lipidique, et les travaux de Conforti et ses collaborateurs (2008) qui ont prouvé que les extraits de *Malva sylvestris* possèdent une activité importante dans le test de blanchissement de B carotène qui est en fait un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreira *et al.*, 2006), on peut supposer que l'amélioration de la résistance du sang à l'attaque radicalaire par les extraits de *Malva parviflora* est attribuée en partie à l'inhibition de la peroxydation lipidique et donc la protection des cellules contre la lyse oxydative.

Conclusion et perspectives

Dans le présent travail, nous avons évalué l'effet anti-inflammatoire et anti-oxydant de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles de *Malva parviflora*

L'inhibition du développement de l'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris permet de conclure que l'extrait méthanolique et aqueux possèdent une activité anti-inflammatoire importante lorsqu'ils sont administrés par voie orale. Cette activité est comparable à celle de l'indométacine qui est un anti-inflammatoire standard. Ceci est confirmé par les résultats du test de la perméabilité vasculaire induite par l'acide acétique chez la souris.

D'une autre part, l'inhibition du développement de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris permet de conclure que l'extrait méthanolique appliqué localement possède un effet anti-inflammatoire significativement supérieur à celui de l'indométacine, tandis que l'extrait aqueux n'a aucun effet.

Les deux extraits des feuilles de *Malva parviflora* possèdent une activité antioxydante importante *in vitro*. Ils montrent une inhibition vis-à-vis du radical DPPH et possèdent une activité chélatrice vis-à-vis du fer ferreux. En outre, ils possèdent une activité antioxydante *in vivo*. En effet, le retardement du temps de demi-hémolyse des érythrocytes par l'extrait méthanolique et par l'extrait aqueux montre que ces deux extraits augmentent significativement et d'une manière dose-dépendante la capacité anti-oxydante totale du sang.

L'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits des feuilles de *Malva parviflora* montre que cette plante possède un fort pouvoir pharmacologique, ce qui supporte son usage traditionnel pour le soulagement de diverses affections inflammatoires.

Les résultats obtenus dans cette étude sur les effets anti-inflammatoires et antioxydants des extraits de *Malva parviflora* sont intéressants, mais des études complémentaires approfondies sont nécessaires pour comprendre leurs mécanismes moléculaires et cellulaires. Ces études doivent être focalisées sur la recherche des composés bioactifs dans les extraits de *Malva parviflora* et l'évaluation de l'effet de ces composés sur les cellules inflammatoires et leurs voies de signalisation, les enzymes impliquées dans la production des espèces oxygénées réactives et sur les systèmes antioxydants.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afolayan A J, Aboyade O M, Sofidiya (2008). Total Phenolic Content and Free Radical Scavenging Activity of *Malva parviflora* L. (malvaceae). *Journal of Biological Sciences*, **8**, 945-949.
- Ahsan H, Ali A, Ali R (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and experimental immunology*, **131**, 398-404.
- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Gaillard M, Prost J, Faivre B, Sorci G (2004) An Experimental Test of the Dose-Dependent Effect of Carotenoids and Immune Activation on Sexual Signals and Antioxidant Activity. *the american naturalist*, **164**, 651-659.
- Ames B N (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res*, **206**, 3-32.
- Aquila S, Giner R M, Recio M C, Spegazzini E D, Ríos J L (2009). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, **121**, 333-337.
- Aruma O I (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, **8**, 53-63.
- Atta A H, Alkofahi A (1998) Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, **60**, 117-124.
- Babior B M, Lambeth J D, Nauseef W (2002). The neutrophil NADPH Oxidase. *Arch Biochem Biophys*, **397**, 342-344.
- Barnes P J (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids : molecular mechanisms. *Clinical Science*, **94**, 557-572.
- Bartosz G (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, **9**, 5-21.
- Beani J. C. (1995). Actions biologiques du rayonnement solaire sur la peau. *Revue Internationale de Pédiatrie*, **259**, 2-7.
- Beckman K B, Ames B N (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, **78**, 547-581.
- Berger M M (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **20**, 48-53.
- Beta T, Nam S, Dexter J E, Sapirstein H D (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal chemistry*, **82**, 390-393.
- Bidaut-Russell M (2001) Adverse gastrointestinal effects of NSAIDs: consequences and costs. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **15**, 739-753.

- Birklein F, Schmelz M (2008). Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neuroscience Letters*, **437**,199-202.
- Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Delattre J (2003). Radicaux libres et anti-oxydants. In : *Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires*. Delattre J, Durand, G, Jardillier J C. Eds, Flammarion (Paris), pp: 59-81.
- Börzsei R, Pozsgai G, Bagoly T, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z (2008). Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neuroscience*, **152**, 82-88.
- Botting RM, Botting JH (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. *Clinical Drug Investigation*, **19**, 1-7.
- Bruneton J (1999). *Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales*. Eds Tec & Doc (Paris), pp: 111.
- Carey1 W M, Babu J M, Rao V, Mohan K (2008). Antiinflammatory activity of the fruit of *Kigelia pinnata* Dc. *Pharmacologyonline*, **2**, 234-245.
- Cash T, Pan Y, Simon M C (2007). Reactive oxygen species and cellular oxygen sensing. *Free radical biology & medicine*, **43**, 1219-1225.
- Catelan S C, Belentani R M, Marques L C, Silva E R, Silva M A, Caparroz-Assef S M, Cuman R K N , Bersani-Amado C A (2006). The role of adrenal corticosteroids in the anti inflammatory effect of the whole extract of *Harpagophytum procumbens* in rats *Phytomedicine*, **13**, 446-451.
- Chen Q, Vazquez E J, Moghaddas S, Hoppel C L. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria. Central role of complex III. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 36027-36031.
- Cheng C, Wang Z (2006). Bacteriostatic activity of Anthocyanin of *Malva sylvestris*. *Journal of Forestry Research*, **17**, 83-85.
- Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti G A, Uzunov D, Tubaro, A Menichini F, Della Loggia R (2008). *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **116**, 144–151.
- Cutillo F, D'Abrosca B, DellaGreca M, Fiorentino A, Zarrelli A (2006). Terpenoids and phenol derivatives from *Malva sylvestris*. *Phytochemistry*, **67**, 481–485.
- Dallal M M, Chang S W (1994). Evans blue dye in the assessment of permeability-surface area product in perfused rat lungs. *Journal of Applied Physiology*, **77**, 1030-1035
- Defraigne J O, Pincemail J (2008). Stress oxydant et antioxydants : mythes et réalités. *Revue médicale de Liège*, **63**, 10-19.

- Delaporte R H, Sarragiotto M H, Takemura O S, S´anchez G M, Filho B P D, Nakamura C V (2004). Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker – Bromeliaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, **95**, 229–233.
- Densiov E T, Afanas’ev I B (2005). *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology*. Eds, Taylor & Francis Group (U.S.A), pp: 703-861.
- Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V (1996). Cytokines pro-inflammatoires et cellules phagocytaires. *Revue Française d’Allergologie et d’Immunologie Clinique*, **36**, 310-314.
- Djeridane, A, Yousfi M, Nadjemi B, Vidal N, Lesgards JF, Stocker P (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, **224**, 801-809.
- Dombrowicz D, Capron M (2001). Eosinophils, allergy and parasites. *Current Opinion in Immunology*, **13**, 716-720.
- Dürmüller N, Graham J L, Sowinski P, Meldrum B S (1997). The vital dye Evans blue mimics limbic seizures induced by kainate or pilocarpine. *Brain Research*, **753**, 283-290.
- Duwiejua M, Zeitlin I J (1993). Plants as source of anti-inflammatory substances. In : *Drugs from Natural Products: Pharmaceuticals and Agrochemicals*. Harvey A L. Eds, Taylor & Francis (Royaume-Uni), pp: 153.
- Elmastaş M, Gülçin İ, İşildak Ö, Küfrevioğlu Ö İ, İbaoglu K, Aboul-Enein H Y (2006). Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. *Journal of the Iranian Chemical Society*, **3**, 258-266.
- Eming S A, Krieg T, Davidson J M (2007). Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, **127**, 514–525.
- Erdemoglu N, Küpeli E, silada E Y (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, **89**, 123–129.
- Fauve R M, Hevin M (1998). Réaction inflammatoire et réactions immunitaires. In: *inflammation*. Russo-Marie F, Peltier A, Polla B S. Eds, John Libbey Eurotext (France), pp: 10-19.
- Favier A (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L’actualité Chimique*, **11-12**, 108-115.
- Ferreira A, Proenc C, Serralheiro M L M, Ara’ujo M E M (2006). The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, **108**, 31–37.

- Geronikaki A A, Gavalas A M (2006). Antioxidants and Inflammatory Disease: Synthetic and Natural Antioxidants with Anti-Inflammatory Activity. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **9**, 425-442.
- Ghedira K (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, **4**, 162-169.
- Girard A, Madani S, Boukourt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J, Prost J (2006). Fructose enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutrition*, **22**, 758–766.
- González-Gallego J, Sánchez-Campos S, Tuñón M J (2007) Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, **22**, 287-93.
- Goudable J et Favier A (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **11**, 115-20.
- Granger D N, Rutili G, McCord J M (1981). Role of superoxide in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, **81**, 22–29.
- Grierson D S, Afolayan A J (1999). Antibacterial activity of some indigenous plants used for the treatment of wounds in the Eastern Cape, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, **66**, 103–106.
- Gutteridge J M (1993). free radicals in disease processes : a complication of cause and consequence. *Free radical research communications*, **19**, 141-158.
- Gurbuz I, zkan A M O, Yesilada E, Kutsal O (2005). Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, **101**, 313–318.
- Halliwell A, Gutteridge J M C (1990). The antioxidant of human extracellular fluids. *Archives of biochemistry and biophysics*, **280**, 1-8.
- Halliwell B, Whiteman M (2004). Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, **142**, 31-2.
- Harrison D, Griending K K, Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, **91**, 7-11.
- Havsteen B H (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. **96**, 67-202.
- Hennebelle T, Sahpaz S, Bailleul F (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, **1**, 3-6.
- Henzen C (2003). Traitement aux glucocorticoïdes: risques et effets secondaires. *Forum médical suisse*, **19**, 442-446.

- Hogan S P, Rosenberg H F, Moqbel R, Phipps S, Foster P S, Lacy P, Kay A B, Rothenberg M E (2008). Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. *Clinical and Experimental Allergy*, **38**, 709–750.
- Imlay J A, Linn S (1998). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, **240**, 1302-1309.
- Iwalewa E O, McGaw L J, Naidoo V, Eloff J N (2007). Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*, **6**, 2868-2885.
- Januário A H, Santos S L, Marcussi S, Mazzi M V, Pietro R C L R, Sato D N, Ellena J, Sampaio S V, França S C, Soares A M (2004). Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions*, **150**, 243-251.
- Jauzein P (1995). *Flore des champs cultivés*. Eds Quae (France), pp: 491-497.
- Jeon H, Kang H, Jung H, Kang Y, Lim C, Kim Y, Park E (2008). Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *Journal of Ethnopharmacology*, **115**, 82–88.
- Jones W P, Kinghorn D (2006). Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: *natural products isolation*. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds, Humana Press (Totowa), pp: 334-335.
- Jüni P, Nartey L, Reichenbach S, Sterchi R, Dieppe P A, M Egger (2004). Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. *Lancet*, **364**, 2021–29.
- Kim H K, Namgoong S Y, Kim H P (1993). Antiinflammatory Activity of Flavonoids: Mouse Ear Edema Inhibition. *Archives of pharmacal research*. **16**, 18-24.
- Kim K M, Pae H, Zhung M, Ha H, Ha Y A, Chai K, Cheong Y, Kim J, Chung H (2008). Involvement of anti-inflammatory heme oxygenase-1 in the inhibitory effect of curcumin on the expression of pro-inflammatory inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **62**, 630-636.
- Koehlin-Ramonatxo C (2006). Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation , or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*, **20**, 165, 177.
- Kohen R, Nyska A (2002). Oxidation of biological systems : oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, **30**, 620-650.
- Kolayli S, Ocak M, Kucuk M, Abbasoglu R (2004). Does caffeine bind to metal ions. *Food chemistry*, **84**, 383-388.
- Kou J, Si M, Dai G, Lin Y, Zhu D (2006). Antiinflammatory activity of Polygala japonica extract. *Fitoterapi*, **77**, 411–415.
- Krabat B J, Jarman S J (2004) History and physical examination. In: *Pain medicine and management: just the facts*. Wallace M, Staats P S. Eds, McGraw-Hill (New York), pp: 48;

- Lehucher-Michel M.P, Lesgards J F, Delubac O, Stocker P, Durand P, Prost M (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*, **30**, 1076-1081.
- Li H, Lu X, Zhang S, Lu M, Liu H (2008). Anti_Inflammatory Activity of Polysaccharide from *Pholiota nameko*. *Biochemistry*, **73**, 669-675.
- Liebler D C, Kling D S, Reed D J (1986). Antioxidant protection of phospholipids bilayers by Tocopherol. *The Journal of biological chemistry*, **2**, 12114-12119.
- Lin J K, Weng M S (2006). Flavonoids as Nutraceuticals. In : *The science of flavonoids*. Grotewold, E. Eds, *Springer*, pp: 217.
- Lin Y C, Brown K, Siebenlist U (1995). Activation of NF-kappa B requires proteolysis of the inhibitor I kappa B-alpha: signal-induced phosphorylation of I kappa B-alpha alone does not release active NF-kappa B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **92**, 552-556.
- Madden K, Flowers L, Salani R, Horowitz I, Logan S, Kowalski K, Xie J, Mohammed S I (2009). Proteomics-based approach to elucidate the mechanism of antitumor effect of curcumin in cervical cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **80**, 9-18.
- Male D (2007). Mécanisme de l'immunité innée. In: *Immunologie*. Male D, Roitt Y, Brostoff J, Roth D B. Eds, Masson (France), pp: 155.
- Manga H M, Brkic D, Marie D E P, Quetin-Leclercq J (2004). In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **92**, 209–214.
- Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry*, **89**, 411-420.
- Marfak A, (2003). Radiolyse gamma des flavonoides, Etude de leur reactive avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges. 187 p.
- Martínez-Cayuela M (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77**, 147 161.
- Marwah R G, Fatope M O, Al Mahrooqi R, Varma G B, Al Abadi H, Al-Burtamani S K S (1991). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. Free radicals in health and disease. *Indian Journal of Clinical Practice*, **2**, 15–26.
- Mathy M, Sanchez C, Priem F, Henrotin Y (2007) La curcumine inhibe la synthèse d'interleukine-6, d'interleukine-8, de monoxyde d'azote et de prostaglandine E2 par les chondrocytes bovins. *Revue du Rhumatisme*, **74**, 10-11.
- Mavi A, Terzi Z , O zgen U, Yildirim A, cos, Kun M (2004). Antioxidant Properties of Some Medicinal Plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia*

(Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae) *Biological & pharmaceutical bulletin*, **27**, 702—705.

- Milane H (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur. 155 p.
- Moon J K, Shibamoto T (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components *Journal of agricultural and food chemistry*, **57**, 1655-1666.
- Moreno-Salazar S F, Robles-Zepeda R E, Johnson D E (2008). Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, Mexico. *Fitoterapia*, **79**, 132–141.
- Mosquera O M, Correa Y M, Buitrago D C, Niño J (2007) Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**, 631-634.
- Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka Y, Fukuda Y (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *biochemical pharmacology*, **71**, 1331–1336.
- Nathan C (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, **420**, 19-26.
- Navarro Garcia V M, Gonzalez A, Fuentes M, Aviles M, Rios M Y, Zepeda G, Rojas M G (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, **87**, 85–88.
- Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. *American Journal of Clinical Nutrition*, **62**, 1322-1326.
- El S, Karakaya S (2004). Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **55**, 67-74.
- Okoli CO, Akah P A, Nwafor S V, Anisiobi A I, Ibegbunam I N, Erojikwe O (2007) Anti inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 219–225.
- Pal Yu B (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species . *Physiopathological Reviews*, **74**, 139-155.
- Payne D N R, Adcock I M (2001). Molecular mechanisms of corticosteroid actions. *Paediatric Respiratory Reviews*, **2**, 145–150.
- Pietta PG (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod*, **63**, 1035-1042.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne J O (2002). Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, **16**, 233-239.

- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne J O (1998). Fumée de cigarette: une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. *Medi Sphère*, **78**, 37-39.
- Puppo A (1992). Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton- Type Reactions; Influence of the Iron Chelator. *Phytochemistry*, **31**, 85-88.
- Rankin JA (2004). Biological mediators of acute inflammation. *AACN Clinical Issues*, **15**, 3 17.
- Regnault JP (1992). Réactions immunitaires. In *Agression et défense du corps humain*. Vigot, (Paris), pp 202-225.
- Richardson J D, Vasko M R (2002). Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. *Perspectives in Pharmacology*, **302**, 839–845.
- Rodrigues M R, Rodriguez D, Russo M, Campa A (2002). Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochemical and biophysical research communications*, **292**, 869-873.
- Rotelli A E, Guardia T, Juárez A O, de la Rocha N E, Pelzer L E (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*, **48**, 601-606.
- Samaniego-Sánchez C, González A M T, García-Parrilla M C, Granados J J Q, Serrana H L, Martínez M C L (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*. **593**: 103-107.
- Scartezzini P, Speroni E (2000). medicine with antioxidant activity Review on some plants of Indian traditional. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**, 23–43.
- Schoroderet M (1992). *Pharmacologie, des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques*. Volume 2. Eds, Office des publications universitaires (Alger), pp : 523-530.
- Seidel V (2005). Initial and Bulk Extraction. In: *natural products isolation*. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds, Humana Press (Totowa), pp: 27-37.
- Setty A R, Sigal L H (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, **34**, 773-784.
- Sies H, Stahl W (1995). Vitamin E and C, Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *American journal of clinical nutrition*, **62**, 1315-1321.
- Sorg O (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*, **327**, 649-662.
- Steinhuibl S R (2007). Platelets as Mediators of Inflammation. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **21**,115-121.

- Stocker P, Lesgards J F, Vidal N, Chalier F, Prost M (2003). ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1621**, 1-8.
- Suresh-Kumar K, Ganesan K, Subba Rao P V (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty - an edible seaweed. *Food Chemistry*, **107**, 289-295.
- Tadeg H, Mohammed A, Asres K, Gebre-Mariam T (2005). Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 168–175.
- Tubaro A, Dri P, Delbello G, Zilli C, Della Loggia R (1985). The Croton oil ear test revisited. *Agents and Actions*, **17**, 3-4.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Biocell*. **39**, 44-84.
- Vonkeman H E, Laar M A V (2008). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. *Seminars in arthritis and rheumatism*, **10**, 10-16.
- Wang X, Bunkers G J, Walters M R, Thoma R S (2001). Purification and Characterization of Three Antifungal Proteins from Cheeseweed (*Malva parviflora*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **282**, 1224–1228.
- Wang Z (2005). Impact of anthocyanin from *Malva sylvestris* on plasma lipids and free radical. *Journal of Forestry Research*, **16**, 228-232.
- Watanabe T, Misawa S, Hiradate S, Osaki M (2008). Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytologist*, **178**, 581 – 589.
- Weill B, Batteux F, Dhainaut J (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. ds, De Boeck Université (Paris), pp: 12-23.
- Weir M R, Sperling R S, Reicin A, Gertz B J (2003). Selective COX-2 inhibition and cardiovascular effects: A review of the rofecoxib development program. *American Heart Journal*, **146**, 591-604.
- Wiat C (2006). *Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and the Pacific*. Eds, Humana Press (Totowa), pp: 1-20.
- Wilhelm D L (1973). Mechanisms Responsible for Increased Vascular Permeability in Acute Inflammation. *Agents and Actions*, **3/5**, 297-306.
- Williams C M M, Galli S J (2000). The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **105**, 847-59.

- Zastawni T, Dabrowska M, Jaskolski T, Klimarkzik M, Kulinski L, Koszela A, Sliwinska M, Witcowski P, Olinski R (1998) Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *Free radical biology & medicine*, **24**, 722-725.
- Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine*. **33**, 337-349.
- Zhou H Y, Shin E M, Guo L Y, Zou L B, Xu G H, Lee S, Ze K R, Kim E, Kang S S, Kim Y S (2007). Anti-inflammatory activity of 21(α , β) methylmelianodiols, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. *European Journal of Pharmacology*, **572**, 239–248.
- Zhou M, Wang H, Gijba S, Kou J, Yu B (2008). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. Leaves extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **117**, 345–350.
- Zweier J L, Talukder M A H (2006). The role of oxidants and free radicals in reperfusion Injury. *Cardiovascular Research*, **70**, 181-190.