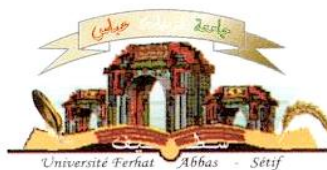


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2018

THÈSE

Présentée par

BOUDEN Ismail

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Etude de l'activité antiarthritique, antioxydante et
antimicrobienne des extraits de *Matricaria pubescens***

Soutenue publiquement le/...../2018

DEVANT LE JURY

Président	BAGHIANI Abderrahmane	Professeur	Univ. F A Sétif 1
Directeur	ARRAR Lekhmici	Professeur	Univ. F A Sétif 1
Examineurs	NECIB Youcef	Professeur	Univ. Constantine 1
	BENDJEDDOU Dalila	Professeur	Univ. Guelma
	KHETTAL Bachra	Professeur	Univ. Bejaia
	BELHADJ Hani	MCA	Univ. Sétif 1

Laboratoire de Biochimie Appliquée

Remerciements

*A*vant tout, mes remerciements infinis sont adressés à « Allah » de m'avoir donné le courage et la santé pour achever ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et toute ma reconnaissance à l'égard de Monsieur **Lekhmici ARRAR**, Professeur à l'Université Ferhat Abbas- Sétif pour avoir accepté de diriger ce travail et son accueil au Laboratoire de Biochimie Appliqué, pour m'avoir fait confiance, m'avoir encouragé et conseillé tout en me laissant une grande liberté. Pour son soutien et sa grande générosité, tout le long de mon travail de thèse, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

J'adresse mes sincères remerciements à Pr **Abderrahmane BAGHIANI**, Professeur à l'Université Ferhat Abbas- Sétif 1, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury et d'évaluer ce travail ; qu'il trouve ici l'expression de ma grande reconnaissance.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Pr **Dalila BENDJDDOU**, Professeur à l'Université de Guelma, Pr **Youcef NECIB**, Professeur à l'Université de Constantine 1 et Pr **Bachra KHETTAL**, Professeur à l'Université de Bejaia et Dr **BELHADJ Hani**, Maître de conférences à l'Université de Ferhat-Abbas Sétif 1, en acceptant d'examiner ce travail et de faire partie du jury. Qu'ils trouvent ici mes sincères remerciements.

J'adresse de sincères remerciements à tous mes collègues de l'Université de 08 mai 1945 Guelma, de l'Université de Constantine 1 et de l'Université de Sétif, et amis du laboratoire Merci à tous pour leur amitié et pour leur aide précieuse.

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier de tout cœur mes parents, mon épouse et mes frères.

ملخص

أظهرت الدراسة الفيتوكيميائية لنبته القرطوفة تواجد مختلف عناصر الإستقلاب الثانوي في الجزء الهوائي للنبته مثل الفينولات المتعددة والثانينات والسابونوزيدات والكومارينات والجلوكوزيدات. كان معدل المركبات الفينولية معتبرا داخل المستخلصات القطبية. احتوى مستخلص الأستيون المائي المعدل الأكبر من حيث الفينولات المتعددة (129.12 mg EAG/g) أما أكبر معدل للفلافونويدات فسجل لدى المستخلص الميثانولي (78.13 mg AC/g) بينما سجل اضعف معدل في مستخلص الأستيون.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات بطريقتي اختبار DPPH وبيتاكاروتين حيث تم تسجيل نشاط مضاد للجذور الحرة جد مهم باستعمال المستخلصات المدروسة بالمقارنة مع السلالات التي تنتمي الى نفس النوع النباتي في العالم. حيث سجل أكبر معدل تثبيط للجذور الحرة مع المستخلص الاسيتوني بنسبة 78.30% وادنى معدل مع المستخلص المائي بنسبة 37.14%.

تم تقييم النشاط المضاد للالتهاب مخبريا لمستخلصات نبتة القرطوفة بطريقتين: الأولى تمثلت في تخريب البنية الثانوية لبروتين ألبومين المصل البقري والثانية من خلال حماية أغشية الكريات الحمراء للإنسان. بينت النتائج أن كل المستخلصات تملك فعالية في اختزال معدل التشوه البروتيني حيث سجل أكبر معدل تثبيط من خلال المستخلص المائي بنسبة 63.08%، وكذا القدرة على حماية الأغشية من التحلل حيث قدر معدل تثبيط هدم الأغشية ب 72.74% باستعمال الجرعة 1.5مغ/مل.

بينت دراسة النشاط المضاد للالتهاب عند الحيوان أن حقن الكراجينين والكولاجين نمط 2 أدى إلى زيادة معنوية في حجم باطن القدم للفئران والجرذان، على التوالي. أدت المعالجة عن طريق الحقن تحت الصفاق وعبر المسلك الفموي للمستخلص المائي (الجرعة 300 مغ/كغ) إلى تقليل حجم الوذمة الحادة والمزمنة. كما سجل انخفاض معنوي في معدل الخلايا المناعية المسؤولة عن الالتهاب في الدم.

أظهرت تقنية الانتشار على الأقراص في الوسط الجيلوزي نشاطا معتبرا للمستخلصات الخام للقرطوفة في تثبيط نمو البكتيريا *Staphylococcus aureus* ونشاطا ضعيفا ضد *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherishia coli*

بينت هذه الدراسة من خلال المستخلصات الخام المدروسة أهمية الاستعمال الواسع لنبته القرطوفة في الطب التقليدي حيث أنها تملك نشاطا مضادا للبكتيريا والأكسدة والالتهاب.

الكلمات المفتاحية: القرطوفة، التهاب المفاصل المحرض، مضاد الأكسدة، مضاد البكتيريا، مضاد الالتهاب.

Résumé

L'étude phytochimique de la partie aérienne de *Matricaria pubescence* a montré la présence de divers métabolites secondaires tels que les polyphénols, les tanins, les saponosides, les terpènes, les coumarines et des glycosides. La teneur en composés phénoliques totaux (CPT) est plus importante dans les extraits polaires. En effet, l'acétone aqueuse renferme la teneur la plus élevée en polyphénols (129.12 mg EAG/g). Le taux maximal de flavonoïdes (78.13 mg ECa/g) est observé dans l'extrait méthanolique et le minimum (44.48 mg ECa/g) dans l'extrait acétone. L'évaluation du potentiel antioxydant des extraits par deux méthodes: le test de DPPH et le test β -carotène, ont révélé une activité anti-radicalaire plus importante de cette plante par rapport aux autres espèces de ce genre dans le monde. Un maximum taux d'inhibition est enregistré avec l'extrait acétone par 78.30% et un minimum taux avec l'extrait aqueux par 37.17%. L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des différents extraits a été évaluée par deux méthodes; la dénaturation de la BSA et la stabilisation des membranes des globules rouges humains. Les extraits bruts de *M. pubescens* présentent une capacité intéressante pour réduire le taux de la dénaturation des protéines, un maximum d'inhibition a été enregistré avec l'infusé avec une valeur de 63.08%. Ils présentent aussi une capacité d'inhiber la lyse des membranes avec un taux de protection de la membrane enregistré avec le même extrait avec 72.74 % à la dose 1.5 mg/ml. L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* montre que l'injection de la carragénine ou du collagène type II entraîne une augmentation très significative du volume de la patte des souris et des rats, respectivement. L'administration (i.p) et par voie orale de l'extrait aqueux (300 mg/Kg de p.c) provoque une diminution du volume de l'œdème de la patte des souris et des rats pendant les heures et les jours de l'expérimentation. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* présente une efficacité sur l'œdème aiguë et chronique de la patte des souris induit par la carragénine, et des rats induit par le collagène type II. Une diminution significative dans le taux des cellules immunitaires intervenant dans les processus inflammatoires est observée. La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé, a montré une activité des extraits bruts de la plante contre la croissance de *Staphylococcus aureus*, et une faible activité inhibitrice de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*; la partie aérienne étant la plus active. En conclusion, l'étude a révélé que *Matricaria pubescence* plante largement utilisée en médecine traditionnelle, possède effectivement des pouvoirs antibactérien, antioxydant et anti-inflammatoire.

Mots clés : *Matricaria pubescence*, arthrite rhumatoïde induite, antioxydant, antibactérien, anti-inflammatoire.

Abstract

The phytochemical study of the aerial part of *Matricaria pubescens* showed the presence of various secondary metabolites such as polyphenols, tannins, saponosides, terpenes, coumarins and glycosides. The content of total phenolic compounds (CPT) is higher in the polar extracts. Aqueous acetone contains the highest content of polyphenols (129.12 mg GAE / g). The maximum level of flavonoids (78.13 mg CaE / g) is observed in the methanolic extract and the minimum (44.48 mg CaE / g) in the acetone extract. The evaluation of the antioxidant potential of the extracts by DPPH and the β -carotene tests revealed a greater anti-radical activity of this plant during the crude extracts tested compared with other species of this genus in the world. A maximum inhibition rate is recorded with the acetone extract by 78.30% and a minimum level with the aqueous extract by 37.17%. The *in vitro* anti-inflammatory activity of the various extracts was evaluated by two methods; denaturation of BSA and stabilization of membranes of human red blood cells. The crude extracts of *M. pubescens* have an interesting capacity to reduce the rate of denaturation of proteins; a maximum of inhibition was recorded with the infused with a value of 63.08%. They also have a membrane lyses inhibition capacity and the protection rate of the membrane was recorded with the same extract with 72.74% at a dose of 1.5 mg / ml. The study of the anti-inflammatory activity *in vivo* shows that the injection of carrageenan or collagen type II leads to a very significant increase in the volume of the paw of mice and rats, respectively. Administration (i.p) and orally of the aqueous extract (300 mg / kg) caused a decrease in the volume of edema of the paw of the mice and the rats during the hours and days of the experiment. The evaluation of the anti-inflammatory activity showed that the aqueous extract of *Matricaria pubescens* is effective on acute and chronic edema of the mouse paw induced by carrageenan, and of the rats induced by collagen type II. A significant decrease in the level of immune cells involved in inflammatory processes was recorded. The disk diffusion method on agar medium, showed an activity of the crude extracts of the plant against the growth of *Staphylococcus aureus*, and a weak inhibitory activity of the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*; the aerial part being the most active. In conclusion, the study revealed that *Matricaria pubescens*, widely used in traditional medicine, have antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory powers.

Keywords: *Matricaria pubescens*, induced rheumatoid arthritis, antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory.

Liste des abréviations

ACPA : Anti-Citrullinated Protein Antibodies	Ig (-A, -E, -M, -G) : Immunoglobuline
AHLs : N-Acyl-Homosérine-Lactones	IL : Interleukin
AIA : Antigen-Induced Arthritis	IL-1Ra : Interleukin-1 Receptorantagonist
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien	MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein -1
ANA : Anti-Nuclear Antibodies	M-CSF : Macrophage Colony-Stimulating Factor
Anti-CII : Anti-Collagène de type II	MIP-1α : Macrophage Inflammatory Protein - 1
Anti-GPI : Anti-Glucose-6-Phosphate Isomérase	MMPs : Matrix Metalloproteinases
Anti-RA33 : Anti-Ribonucleoprotein A2/B1	NAG : N-Acétyl-Glucosamine
DBA/1 : Dilute Brown, non-Agouti mice	NAM : N-Acétyl-Muramique
CDs : Cellules Dendritiques	NF-κB : Nuclear Factor of κ B
CFA : Adjuvant Complet de Freund	NK : Natural Killer
CIA : Collagen Induced Arthritis	PAD : Peptidyl-Arginine Désiminase
CINC-1 : Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1	PAF : Facteur Activateur des Plaquettes
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité	PBS : Phosphate-Buffered Saline
CMIs : Concentrations Minimales Inhibitrices	PDGF : Platelet-derived Growth Factor
CTAP-3 : Connective Tissue-Activating Protein	PR : Polyarthrite Rhumatoïde
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl	QS : Quorum Sensing
EAMP : Extrait Aqueux de <i>Matricaria pubescens</i>	RANK / RANKL : Receptor Activator of NF- κ B / Receptor Activator of NF- κ B Ligand
ENA-78 : Epithelial Neutrophil-Activating Protein	RANTES : Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
EqAG/g MS : Equivalents Acide Gallique par gramme de Matière végétale Sèche	ROS : Reactive Oxygen Species
EqC/g MS : Equivalents Catéchine par gramme de Matière végétale Sèche	SARV : <i>Staphylococcus aureus</i> Résistantes à la Vancomycine
FNS : Formule Numération Sanguine	SCF : Stem Cell Factor
FR : Facteur Rhumatoïde	SOD : Superoxyde Dismutase
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor	STAT6 : Signal Transducer and Activator of Transcription -6
GPx : Glutathion Peroxydase	SCW : Streptococcal Cell Wall
GRH : Globule Rouge Humaine	TIMPs : Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases
GRs : Globule Rouges	Th : T helper
HLA : Human Leukocyte Antigen	TNF-α : Tumor Necrosis Factor- α
IC₅₀ : Inhibitory Concentration of 50 %	TNFR (I / II) : Tumor Necrosis Factor Receptor (I / II)
ICAM-1 : Intra Cellular Adhesion Molecule -1/3	TPT : Teneur en Polyphénols Totaux
IFN (-γ, -α) : Interféron	VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule -1

Liste des figures

Figure 1	Inflammation de la membrane synoviale.....	5
Figure 2	Rôle des synoviocytes dans l'inflammation articulaire.....	6
Figure 3	Rôle des macrophages au cours de la PR.....	11
Figure 4	Rôle des LB et LT dans la pathogénie de la PR.....	13
Figure 5	Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	24
Figure 6	Sites de production intracellulaire des ERO.....	26
Figure 7	Schématisation des molécules intervenant dans les protections cellulaires.....	32
Figure 8	Régulation de la production des espèces oxygénées activées (EOA) par des systèmes antioxydants de défenses primaire et secondaire.....	34
Figure 9	Squelette de base des flavonoïdes.....	49
Figure 10	Structures des flavonoïdes aglycone et glucosylés isolés du genre <i>Matricaria</i> ..	49
Figure 11	Structure de l'Herniarine et l'Umbelliférone.....	51
Figure 12	Structures des sesquiterpènes isolés de l'espèce <i>M. aurea</i>	52
Figure 13	Structure générale des amides.....	52
Figure 14	Structures chimiques de quelques amides isolés du genre <i>Matricaria</i>	53
Figure 15	Photo de la plante <i>Matricaria pubescens</i>	56
Figure 16	Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	62
Figure 17	Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	63
Figure 18	Schéma représentatif du protocole expérimental.....	71
Figure 18	Profils de l'activité antiradicalaire (test DPPH*) des extraits bruts.....	78
Figure 19	Résultats des IC ₅₀ (exprimées en mg/ml) d'inhibition du DPPH des différents extraits bruts.....	78
Figure 20	Profils de l'activité inhibitrice (test de blanchiment de β-carotène) des extraits bruts.....	79
Figure 21	Résultats des IC ₅₀ (exprimées en mg/ml) d'inhibition de blanchissement du β-carotène des différents extraits bruts.....	80
Figure 22	Moyennes des diamètres des zones d'inhibition des différents extraits relatives aux différentes souches selon la méthode des disques.....	82
Figure 23	Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte des groupes testés.....	88

Figure 24	Pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème des pattes droites des souris. Les valeurs représentent les moyennes \pm standard erreur moyenne. (n=6).....	90
Figure 25	Taux des leucocytes chez les différents groupes traités.....	91
Figure 26	Taux des lymphocytes chez les différents groupes traités.....	92
Figure 27	Taux des granulocytes chez les différents groupes traités.....	93
Figure 28	Photographies des pattes des rats	96
Figure 29	Effet de l'extrait aqueux de <i>Matricaria pubescens</i> sur l'œdème des pattes induites par le CII chez le rat. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 5).....	97
Figure 30	Photographies des pattes des rats traités: CIA + extrait aqueux de <i>M.</i> <i>pubescens</i> (A) : 100 mg/kg, (B) : 200 mg/kg.....	97
Figure 31	Effet d'extraits aqueux de <i>Matricaria pubescens</i> sur le poids corporel des rats arthritique et les rats arthritique traité.	98
Figure 32	Pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème des pattes des rats. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. (n=5).....	100

Liste des tableaux

Tableau 1	Classification systématique de <i>M. pubescence</i>	55
Tableau 2	Description et pouvoir pathogène des souches testées.....	66
Tableau 3	Rendement d'extraction et la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits testés.....	75
Tableau 4	Pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA des extraits bruts de <i>Matricaria pubescens</i>	84
Tableau 5	Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des GRH des extraits bruts de <i>Matricaria pubescens</i>	87
Tableau 6	Taux des cellules immunitaires chez les différents groupes testés.....	99

SOMMAIRE

<i>Introduction</i>	1
---------------------------	---

Etude bibliographique

Chapitre 1 : Inflammation et Polyarthrite Rhumatoïde

1. Polyarthrite Rhumatoïde.....	4
1.1. Cellules de la réponse immunitaire innée.....	6
1.1.1. Neutrophiles.....	6
1.1.2. Mastocytes.....	8
1.1.3. Plaquettes.....	9
1.1.4. Monocytes / macrophages.....	9
1.1.5. Cellules dendritiques.....	10
1.1.6. Cellules Natural Killer.....	11
1.2. Cellules de la réponse immunitaire adaptative.....	12
1.2.1. Lymphocytes B.....	12
1.2.2. Lymphocytes T.....	13
1.3. Médiateurs de l'inflammation.....	15
1.3.1. Auto-anticorps.....	15
1.3.2. Cytokines et chimiokines.....	17
1.3.2.1. Cytokines pro-inflammatoires.....	17
1.3.2.2. Cytokines anti-inflammatoires.....	19
1.3.2.3. Chimiokines.....	20
1.3.3. Enzymes métalloprotéases.....	21

Chapitre 2 : Radicaux libres et stress oxydatif

1. Radicaux libres.....	23
1.1. Espèces réactives de l'oxygène(ERO).....	23

1.2 Espèces réactives azotées (ERN)	25
1.3. Production de radicaux libres	26
1.3.1. Production intracellulaire.....	26
1.3.2. Production extracellulaire.....	28
1.4. Rôles des ERO.....	28
2. Stress oxydant ou oxydatif.....	30
3. Pouvoir antioxydant.....	31
3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes.....	31
3.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques.....	32

Chapitre 3 : Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes

3.1. Généralités.....	39
3.1.1. Phénotype de résistance (antibiotype)	39
3.1.2. Support génétique de la résistance.....	40
3.1.2.1. Résistance naturelle.....	40
3.1.2.2. Résistance acquise.....	40
3.1.3. Facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance.....	41
3.1.4. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne.....	41
3.2. Place des plantes médicinales dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques.....	43
3.2.1. Plantes, source naturelle d'antimicrobiens.....	43
3.2.2. Plantes, source naturelle d'inhibiteurs de l'efflux bactérien.....	44
3.2.3. Plantes, productrices d'analogues des N-acylhomosérine-lactones (AHLs).....	44

Chapitre 4 : Matricaria pubescens

1. Genre Matricaria.....	46
2. Utilisations des matricaires.....	47
3. Métabolites secondaires de genre Matricaria.....	48
3.1. Flavonoïdes.....	48
3.2. Coumarines.....	50
3.3. Sesquiterpènes.....	51

3.4. Amides.....	52
4. Espèce <i>Matricaria pubescens</i>	54
4.1. Nomenclature de plante.....	54
4.2. Classification.....	55
4.3. Description morphologique.....	55
4.4. Distribution géographique.....	56
4.5. Utilisation traditionnelle de la plante.....	56
4.6. Domaines d'utilisation.....	57
4.6.1. Alimentation.....	57
4.6.2. Médication.....	57

Deuxième partie : Etude expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel biologique.....	58
1.1. Matériel végétal.....	58
1.2. Matériel animal.....	58
2. Méthodes.....	58
2.1. Screening phytochimique.....	58
2.1.1. Test des alcaloïdes.....	59
2.1.2. Test des saponosides.....	59
2.1.3. Test des flavonoïdes.....	59
2.1.4. Test des coumarines.....	59
2.1.5. Test des stérols et triterpènes.....	60
2.1.6. Test des Tanins.....	60
2.1.7. Test des glycosides.....	60
2.2. Préparation des extraits bruts.....	60
2.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques.....	61
2.3.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	61
2.3.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux.....	62
3. Pouvoir antioxydant des extraits bruts.....	63

3.1. Piégeage du DPPH.....	63
3.2. Inhibition du blanchiment du β -carotène.....	64
4. Pouvoir antibactérien des extraits bruts.....	65
4.1. Méthode de diffusion sur disque.....	66
5. Effet anti-inflammatoire de <i>Matricaria pubescens</i>	67
5.1. Inhibition de la dénaturation des protéines.....	67
5.2. Stabilisation de la membrane des globules rouges humains.....	68
5.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (Inflammation aigue) <i>in vivo</i>	69
5.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (Inflammation chronique) <i>in vivo</i>	70
5.5. Taux des cellules immunitaire	71
6. Analyses statistique.....	72

Résultats et discussion

1. Screening phytochimique.....	73
2. Rendements des extractions.....	75
3. Teneur en polyphénols totaux	76
4. Teneur en flavonoïdes totaux.....	77
5. Potentiel antioxydant des extraits bruts.....	77
5.1. Piégeage du radical DPPH [*]	77
5.2. Inhibition du blanchiment de β -carotène.....	79
6. Pouvoir antibactérien des extraits bruts.....	81
7. Activité Anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	84
7.1. Inhibition de la dénaturation du BSA.....	84
7.2. Stabilisation des membranes des globules rouge humains.....	86
8. Activité Anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	88
8.1. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte	88
8. 2. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte	89
8. 3. Taux des cellules immunitaire (leucocyte, lymphocyte et granulocyte).....	91
8.4. Effet de l'extrait aqueux sur l'arthrite induite par le collagène.....	95
8.4.1. Induction de l'arthrite rhumatoïde chez le rat.....	95
8.4.2. Effet anti-œdémateux de l'extrait aqueux de <i>Matricaria pubescens</i>	96

8.4.3. Effet sur le poids corporel des rats.....	97
8.4.4. Effet sur certains paramètres cellulaires et sériques	98
8.4.5. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte	99
<hr/> Conclusion et perspectives	104
<hr/> Références bibliographique	107
<hr/>	

Introduction

Durant des siècles et même des millénaires, l'Homme a utilisé les plantes pour soulager ses douleurs, guérir ses maux et panser ses blessures. Actuellement et malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent surtout dans les pays en voie de développement. En effet, parmi environ 500.000 espèces de plantes, 80.000 possèdent des propriétés médicinales. En Afrique, où les médicaments à base de plantes sont toujours utilisés par de nombreuses populations pour des soins sanitaires où le pouvoir thérapeutique des plantes était connu de façon empirique.

La flore algérienne est estimée à plus de 3000 espèces de plantes dont 15% sont endémiques et appartiennent à plusieurs familles botaniques. Ce potentiel floristique, d'intérêt biomédical a poussé les chercheurs à explorer ces ressources sur le plan phytochimique ainsi que sur le plan pharmacologique. L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie. En effet, les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches. A titre indicatif, ces composés font partie et sont, à faibles doses, dotés de propriétés pharmacologiques et toxicologiques remarquables. De même, les polyphénols, forment un groupe très diversifié de molécules dont plusieurs sont largement utilisées en thérapeutique comme antioxydants pour lutter contre les effets néfastes de l'oxygène à l'origine d'un grand nombre de maladies.

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme à diverses agressions qui peuvent être d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse (réponse immunitaire). Le traitement actuel de l'inflammation fait appel aux anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens comme l'aspirine. Ces molécules bien qu'étant efficaces

présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation à long terme.

Au début des années 1970, les médecins ont finalement été contraints d'abandonner leur croyance que les infections bactériennes étaient pratiquement toutes traitables. Leur optimisme a été ébranlé par l'émergence de la résistance à plusieurs antibiotiques chez les agents pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Mycobacterium tuberculosis*. En plus de ce problème, les antibiotiques sont parfois associés à des effets indésirables sur l'hôte telle que l'hypersensibilité. Par conséquent, il existe un besoin de développer des médicaments antimicrobiens alternatifs pour le traitement des maladies infectieuses à partir des plantes médicinales qui semblent moins agressifs.

D'autre part, les antioxydants jouent un rôle important dans la prévention des maladies, et parce que certains antioxydants synthétiques ont montré un risque potentiel pour la santé, notamment un effet cancérigène possible ; il y'a lieu de trouver de nouvelles sources d'antioxydants peu dangereuses peu coûteuses et naturelles pour les utiliser dans les aliments et les préparations pharmaceutiques et remplacer ainsi les antioxydants synthétiques.

En Algérie, la phytothérapie est utilisée depuis toujours dans le secteur de la médecine traditionnelle. Aujourd'hui les plantes jouent encore un rôle très important dans les traditions thérapeutiques 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 sureté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes. Dans ce contexte s'inscrit le présent travail de recherche dont l'objectif essentiel consiste à vérifier l'activité anti-inflammatoire, antioxydante et antibactérienne de certains extraits bruts de la partie aérienne d'une plante médicinale algérienne

appartenant à la famille des Asteraceae du genre *Matricaria*, *Matricaria pubescens* (Desf.) Sch. Bip, une espèce endémique de l'Afrique du Nord (Sahara septentrional), connue pour son utilisation traditionnelle médicinale ainsi que culinaire.

Les objectifs de ce travail peuvent être résumés comme suit :

- Détermination des familles de composés phytochimiques présents dans les extraits de la partie aérienne de la plante et évaluation des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux
- Etude des effets antioxydants des différents extraits
- Evaluation des propriétés anti-inflammatoires *in vitro in vivo*
- Examen des effets antibactériens
- Recherche de corrélation entre les différentes activités et le contenu phytochimique essentiellement les teneurs en polyphénols et flavonoïdes.

Chapitre 1 :Inflammation et polyarthrite rhumatoïde

1. Polyarthrite rhumatoïde

La Polyarthrite Rhumatoïde (PR) est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires. Sa prévalence est d'environ 0,4% en Europe. En Algérie, la polyarthrite rhumatoïde est très fréquente, mais il y a un sérieux déficit d'études épidémiologiques pour donner des statistiques concernant l'évolution de cette maladie. En gros, et selon certaines estimations, elle toucherait de 0,7 à 1% de la population algérienne. C'est un peu plus de 300 000 personnes qui sont touchées par la polyarthrite rhumatoïde avec une très nette prédilection pour les femmes (Kaddem, 2011). Il s'agit d'une inflammation chronique évoluant par poussées, qui affecte principalement les femmes âgées de 30 à 50 ans (3 femmes pour 1 homme) mais qui peut également se déclarer aux extrêmes de la vie (Gabay, 2004). L'atteinte est poly-articulaire, symétrique et touche particulièrement les articulations des mains, des genoux et des pieds, mais elle peut être aussi systémique entraînant des manifestations extra-articulaires qui compromettent le pronostic vital. Elle se traduit par une hypertrophie de la membrane synoviale, tissu recouvrant la face interne des articulations, qui se trouve infiltrée par les différents acteurs cellulaires de l'inflammation (Maclé, 2012). Bien que l'étiologie et la pathogénie de la PR soient encore mal connues, il est établi que la membrane synoviale devient le siège d'une réaction inflammatoire impliquant des interactions entre les différents types cellulaires et les facteurs pro-inflammatoires responsables de la destruction ostéo-cartilagineuse (Foulquier, 2007).

Habituellement, la membrane synoviale est constituée de 1 à 4 assises de cellules synoviales qui fusionnent à leur partie profonde avec une zone de tissu fibreux lâche contenant des adipocytes, des fibroblastes, des mastocytes et des macrophages. Cette couche profonde se confond avec le tissu fibreux plus dense de la capsule articulaire (Boutry et Cotten, 2010). En somme, au cours de la PR, la membrane synoviale devient hyperplasique avec un épaissement de la couche

cellulaire bordante (intima), un infiltrat de cellules inflammatoires périvasculaires, un œdème interstitiel et une néo-angiogénèse (Figure 1).

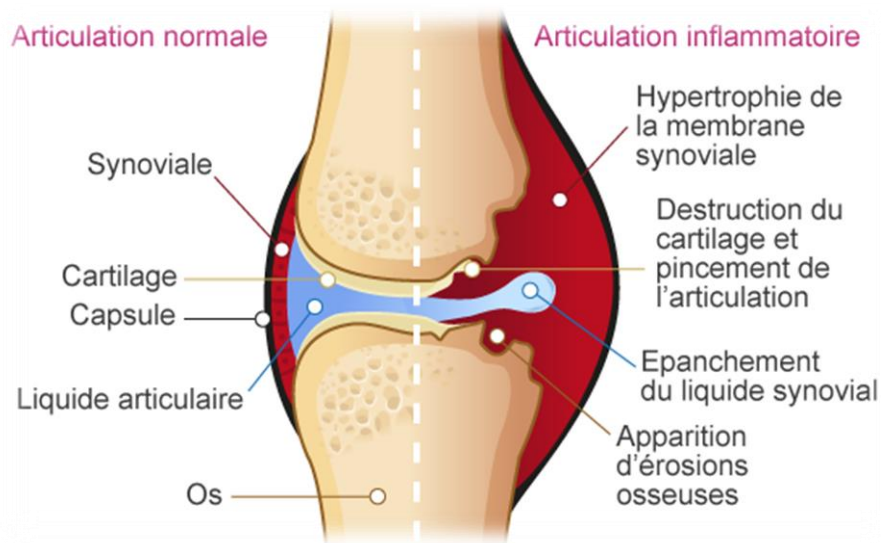


Figure. 1 : Inflammation de la membrane synoviale (Choy et Panayi, 2001).

L'épaississement de l'intima est probablement le résultat d'une prolifération des synoviocytes de type B aboutissant à un pannus synovial responsable de la destruction cartilagineuse et osseuse. En effet, le recrutement important de macrophages conduit à la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et à l'augmentation de la production des métalloprotéases (MMPs). Il s'ensuit un état inflammatoire chronique caractérisé par une infiltration cellulaire où prédominent les monocytes / macrophages, les lymphocytes B et les Lymphocytes T. Ces cellules infiltrant l'espace synovial sont dans un état diffus sans structure spécifique, ou organisées en microstructures. On trouve également des cellules dendritiques, des mastocytes et des plasmocytes qui s'accumulent sous la couche bordante (Takemura *et al.*, 2001). L'implication de ces cellules, ainsi que des différents médiateurs qu'elles expriment, dans l'initiation et l'évolution de l'inflammation au cours de la PR seront abordés par la suite.

1.1. Cellules de la réponse immunitaire innée

1.1.1. Neutrophiles

Les granulocytes ou polymorphonucléaires (PMN) sont classés en 3 catégories : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. En raison de leur nombre élevé au site de l'inflammation par rapport aux éosinophiles et basophiles, les neutrophiles ont été plus largement décrits. Ils constituent des éléments essentiels de la défense contre les pathogènes. Ce sont les premières cellules à migrer au site de l'inflammation, suivies des monocytes. Les neutrophiles libèrent dans l'espace extracellulaire des médiateurs cytotoxiques comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des protéases en dommageant ainsi à la fois le pathogène et le tissu hôte. Il s'ensuit une accumulation dans l'intima de synoviocytes macrophage-like (synoviocytes de type A) et fibroblastelike (synoviocytes de type B) engendrant une hyperplasie de la membrane synoviale et une sécrétion excessive de métalloprotéases (Figure 2), (Nathan, 2006).

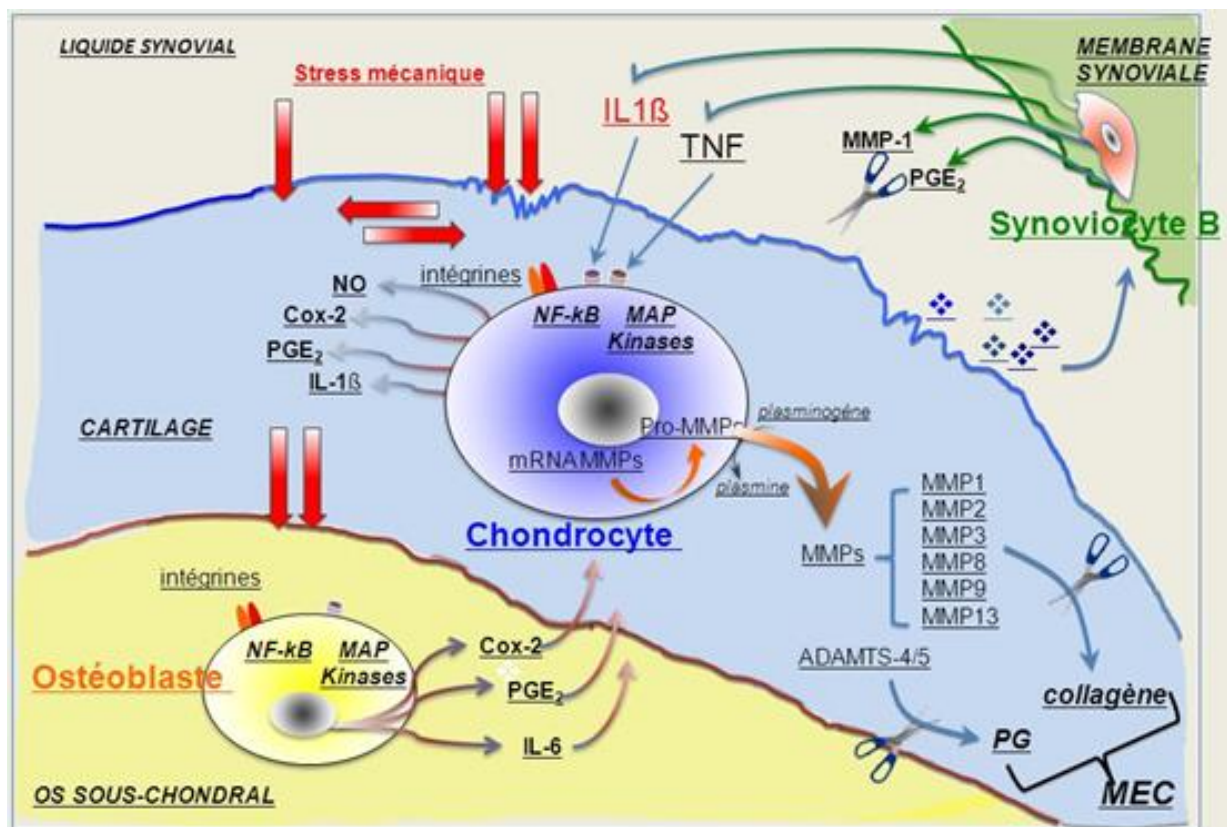


Figure. 2 : Rôle des synoviocytes dans l'inflammation articulaire (Cascão *et al.*, 2010).

Une fois le pathogène éliminé, les neutrophiles entrent en apoptose et sont phagocytés par les macrophages. Dans le cadre de la PR, les mécanismes d'activation, de recrutement et d'apoptose des neutrophiles sont altérés. Dans le cas d'un dysfonctionnement du mécanisme apoptotique, les neutrophiles entament une nécrose. L'ingestion des débris cellulaires par les macrophages induit la production de cytokines pro-inflammatoires amplifiant ainsi le scénario inflammatoire de la PR (Pillon et Michiels, 2014).

En effet, chez les patients atteints de la PR avec une synovite active, les neutrophiles sanguins produisent beaucoup moins de ROS que ceux des individus sains ou les patients en rémission (Cedergren *et al.*, 2007). De plus, chez les patients ayant une arthrite débutante, les neutrophiles sanguins montrent un niveau significativement moins élevé d'apoptose que les neutrophiles des patients présentant d'autres formes d'arthrite (Weinmann *et al.*, 2007). Plus tard, cette même observation a été faite pour les neutrophiles du liquide synovial de patients montrant ainsi que le défaut d'apoptose des neutrophiles est une caractéristique de la PR. Ceci peut être corrélé avec les niveaux élevés de cytokines antiapoptotiques, comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-15 ou le GM-CSF, retrouvés dans les articulations des patients ayant une PR débutante (Raza *et al.*, 2006).

Une étude récente, réalisée sur un modèle d'arthrite induite au collagène, a suggéré que les éosinophiles pourraient être les cellules à l'origine de l'échec des biothérapies anti-TNF- α et anti-CD20 chez certains patients. Bien que ces cellules ne soient pas présentes en nombre élevé dans les articulations de patients atteints de PR, des protéines cationiques ayant pour origine les éosinophiles, sont retrouvées dans le liquide synovial de patients en échec de thérapies anti-TNF- α et anti-CD20. De plus, chez un certain nombre de patients, la sévérité de la PR a été associée à une hyperéosinophilie (Bone *et al.*, 2016).

Quant aux basophiles, ils ont été plus décrits dans le cadre de la sécrétion d'auto-anticorps IgE et d'histamine dans les réactions allergiques auto-immunes associées à la PR. Cette sécrétion est médiée par l'IL-3 et induit l'expression par les basophiles de la cytokine pro-arthritogénique IL-6. En effet, une étude récente, réalisée sur un modèle d'arthrite induite au collagène, a suggéré que l'IL-3 aggrave les premières phases de l'arthrite en permettant l'augmentation du nombre de basophiles activés dans le sang circulant et en induisant l'expression d'anticorps anti-collagène dans le plasma (Bruhl *et al.*, 2009). Cette même étude a montré que l'action de l'IL-3 n'intervient pas dans les phases tardives de la maladie.

1.1.2.Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules granuleuses essentiellement présentes dans le tissu conjonctif et qui pourraient également jouer un rôle précoce dans le processus de la PR. Dans le tissu synovial, les mastocytes sont retrouvés dans l'intima mais peuvent être également retrouvés au niveau des sites de destruction du cartilage. Leur proximité avec les terminaisons nerveuses et les vaisseaux sanguins leur permet d'être en première ligne, avec les neutrophiles et les macrophages, pour initier une réponse inflammatoire et activer les cellules endothéliales. Chez les patients atteints de PR, le nombre de mastocytes est très augmenté (Gotis-Graham *et al.*, 1998).

Comme pour les polynucléaires basophiles, l'IL-3 a été décrite comme une cytokine induisant la prolifération des mastocytes dérivant des précurseurs de la moelle de souris. Il a été montré que les glucocorticoïdes inhibent l'expression de cette cytokine. Dans le cas de la PR, ce type de traitement est efficace pour supprimer quelques aspects de l'inflammation mais ne suffit pas pour traiter la maladie (Eklund *et al.*, 1997).

1.1.3. Plaquettes

Dans le liquide synovial, les plaquettes sécrètent également des quantités importantes de facteurs de croissance. Dans un modèle d'arthrite du lapin, il a été montré que parmi ces facteurs de croissance, le PDGF (Platelet-derived Growth Factor), un puissant agent angiogénique, induit une hyperplasie de la synoviale et la formation du pannus. En effet, la prolifération vasculaire au sein du pannus permet son développement et sa croissance, favorisant secondairement la destruction cartilagineuse (Hayer *et al.*, 2015).

1.1.4. Monocytes / macrophages

De par ses multiples fonctions biologiques, ce système contribue largement au déclenchement et au développement des maladies inflammatoires chroniques, comme la PR. Les cytokines IL-1, IL-3 et SCF (Stem Cell Factor) stimulent les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ pour qu'elles s'engagent dans la lignée myéloïde. Les précurseurs myéloïdes générés expriment CD33, CD34 et HLA-DR et se différencient sous l'effet de M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) et GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) en monocytes matures qui passent dans le sang périphérique. Ces monocytes circulants présentent un phénotype activé (libération de cytokines pro-inflammatoires et de prostanoïdes, expression de molécules d'adhésion), (Grisar *et al.*, 2001 ; Kawanaka *et al.*, 2002). Dans le sang périphérique, ils perdent leur marqueur précoce CD34 et deviennent CD14⁺. Il a été montré que le nombre de cellules CD14⁺ est supérieur chez les patients atteints de PR que chez les sujets sains, suggérant une altération de l'homéostasie monocyttaire en amont de leur activation synoviale. Parmi ces cellules CD14⁺, un grand nombre traverse la barrière trans-endothéliale et migre vers les compartiments articulaires où ils deviennent des macrophages (Ma et Pope, 2005).

Le système monocyte / macrophage représente une part importante de l'immunité innée développée au cours de la PR. L'activation de ce système, qui s'étend à la majorité des précurseurs de la moelle osseuse de la lignée myéloïde, démontre le caractère systémique de cette pathologie.

1.1.5. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques qui jouent un rôle majeur dans la décision du type de réponse immunitaire à mettre en jeu. Elles font partie du système réticulo-histiocytaire et présentent dans certaines conditions, comme leur nom l'indique, des dendrites (des prolongements cytoplasmiques). Elles ne constituent pas une population homogène et regroupent 2 sous-populations dont les phénotypes et les fonctions sont assez bien caractérisés. Il a été montré que, parmi les sous-populations de DCs joue le rôle le plus important dans la pathogénie de la PR. En effet, un nombre élevé de ces cellules a été mis en évidence dans le liquide, mais surtout dans le tissu synovial et ce nombre est corrélé à la sévérité de la PR. Dans la suite, on désignera ces cellules par le simple terme DCs (Pettit *et al.*, 2007).

Par leur puissant pouvoir de présentation de l'antigène, les DCs jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la PR. Elles interviennent aussi dans la transformation phénotypique des Lymphocytes T naïfs en type Th1 ou Th2, selon les cytokines présentes dans le milieu. Les interactions entre DCs et cellules T se font soit à travers des interactions de type récepteur/ligand soit par l'intermédiaire de cytokines et de chimiokines. Les DCs produisent de l'IL-12 et de l'IL-23 qui font basculer la réponse immunitaire vers les types Th1 et Th17, respectivement. L'IL-23 augmente la production lymphocytaire T d'IL-17, qui à son tour va activer les fibroblastes synoviaux et augmenter leur réponse à d'autres signaux provenant des cellules T (Figure 3).

1.1.6. Cellules Natural Killer

Le rôle de ces cellules dans la pathogénie de la PR a été très peu étudié. Dans un modèle animal d'arthrite, la déplétion de ces cellules augmente la production d'auto-anticorps anti-DNA et accélère l'accumulation de Lymphocytes T CD4+ auto-réactifs. L'injection de cellules NK permet, par contre, la suppression de ces manifestations auto-immunes.

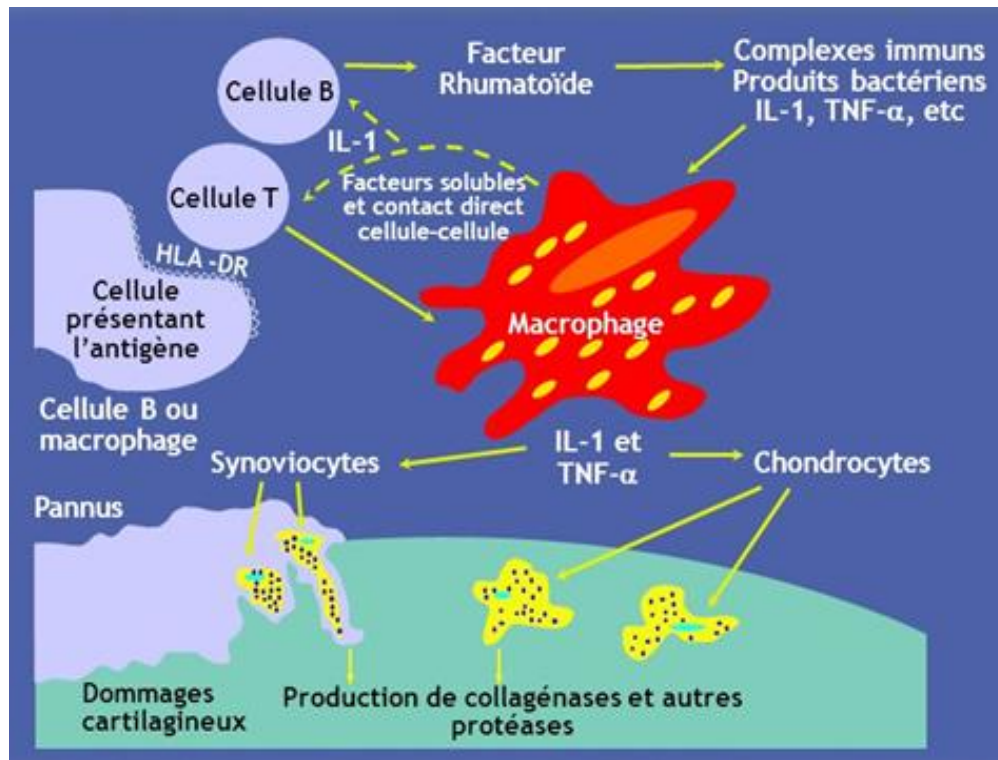


Figure 3 : Role des macrophages au cours de la PR (Grisar *et al.*, 2001).

De plus, Pridgeon *et al.* (2003) ont rapporté que les patients atteints de PR ont un nombre anormalement bas de cellules NK dans le sang périphérique en comparaison avec des individus sains. Toutes ces observations suggèrent donc un rôle protecteur de ces cellules dans la PR. Cependant, ce rôle a été controversé, puisque les cellules NK représentent une large proportion des cellules présentes dans le liquide synovial de patients ayant une PR évoluée et que ces cellules produisent des taux élevés de cytokines essentielles pour la destruction osseuse ainsi que de chimiokines qui participent au recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation. De

plus, une étude plus récente a montré que les cellules NK induisent *in vitro* la différenciation des monocytes en ostéoclastes, cellules responsables de la résorption osseuse. Cette étude a également montré que ces cellules sont aussi présentes dans les articulations de souris arthritiques et que leur déplétion réduit la sévérité de l'arthrite chez souris et prévient l'érosion osseuse (Soderstrom *et al.*, 2010).

1.2. Cellules de la réponse immunitaire adaptative

1.2.1. Lymphocytes B

Les Lymphocytes B (LB) sont les premiers acteurs de la réponse immunitaire adaptative à avoir été mis en évidence dans la pathogénie de la PR. La découverte des facteurs rhumatoïdes (FR), des auto-anticorps souvent de type IgM (mais pouvant être aussi de type IgA ou IgG) produits par les plasmocytes et dirigés contre les IgG, a conduit à l'hypothèse selon laquelle la PR pourrait être une maladie auto-immune causée par des auto-anticorps. Depuis, d'autres auto-anticorps ont été détectés chez les patients atteints de PR : des auto-anticorps anti-CCP (Cyclic Citrullinated Peptide) et des auto-anticorps dirigés contre des antigènes du cartilage comme le collagène de type II ou l'aggrécane (Figure 4). A leur tour, les LB sont également capables d'activer les Lymphocytes T autoréactifs. Ainsi, l'infiltration tissulaire des Lymphocytes T et les manifestations auto-immunes sont dépendantes des LB. En outre, les LB présents dans le thymus jouent un rôle dans l'acquisition du répertoire de Lymphocytes T en régulant la sélection positive de ces cellules (Vita *et al.*, 2016).

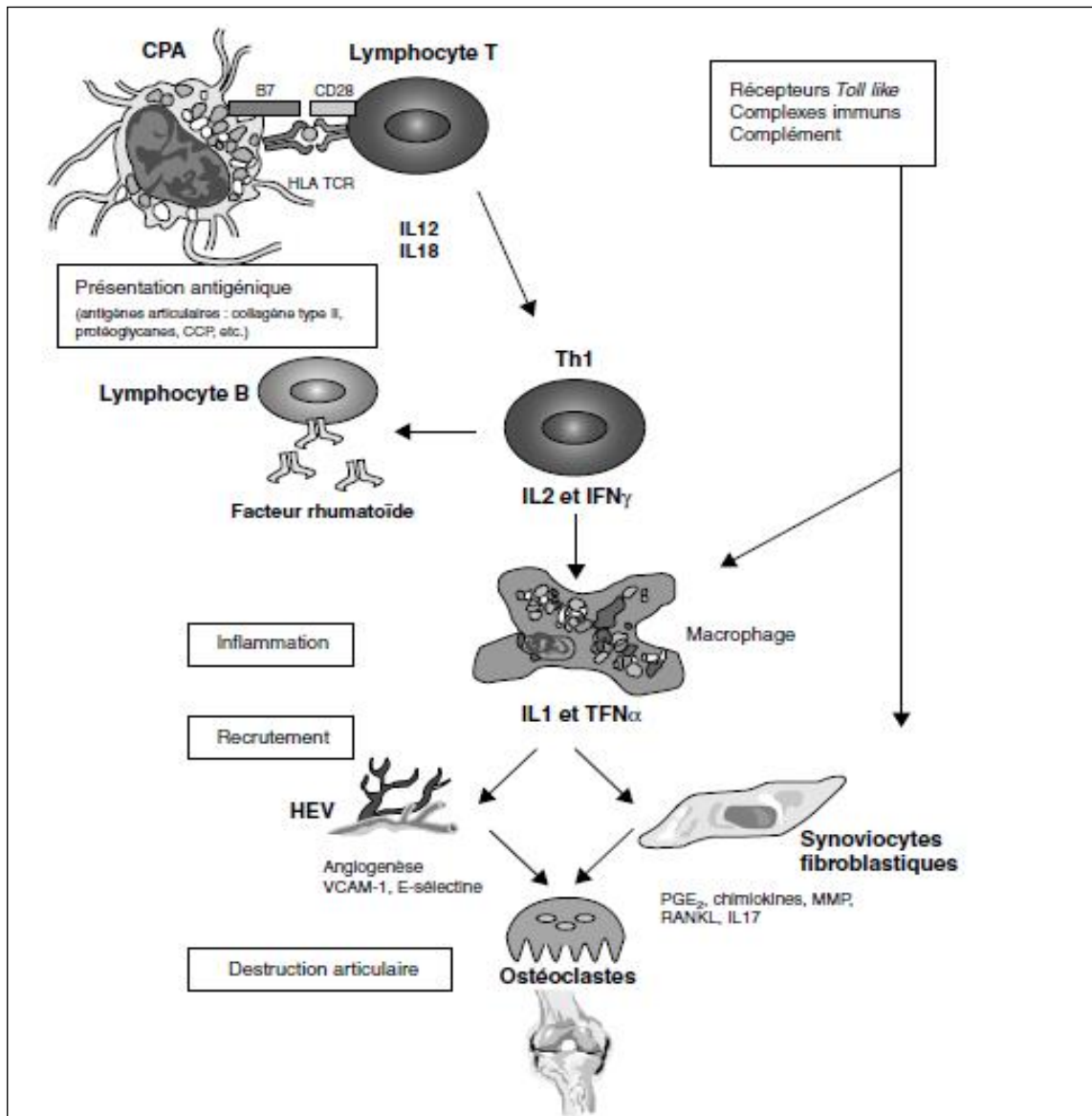


Figure 4 : Rôle des LB et LT dans la pathogénie de la PR (Morel *et al.*, 2004).

1.2.2. Lymphocytes T

De nombreux arguments plaident en faveur d'un rôle essentiel des Lymphocytes T CD4⁺ dans la physiopathologie de la PR. D'une part, ils sont souvent retrouvés en abondance dans le tissu synovial et le liquide articulaire de patients atteints de PR, notamment les LT exprimant le phénotype mémoire CD4⁺CD45RO⁺ et les lymphocytes porteurs de marqueurs d'activation comme le CD40L ou le CD28 (Weyand *et al.*, 2015). D'autre part, les modèles expérimentaux

viennent à l'appui de cette théorie, notamment le modèle d'arthrite induite au collagène dans lequel l'arthrite ne peut être déclenchée en l'absence de LT actifs (Boissier., 2008). Le rôle pivot des LT dans la pathogénie de la PR, est renforcé par l'hypothèse du peptide arthritogène. Le peptide arthritogène pourrait être d'origine exogène (agents infectieux ou super-antigènes) ou endogène (collagène de type II, protéoglycanes, glycoprotéine gp39 chondrocytaire). Il est reconnu par les LT CD4⁺, avec comme conséquences la prolifération et l'activation des LT, des LB et la sécrétion de cytokines et de médiateurs inflammatoires. Cependant, plusieurs arguments plaident contre leur rôle exclusif : (1) la faible quantité de cytokines T-dépendantes (IL-2, IL-3, IL-4 et IFN- α) dans l'articulation par rapport à des cytokines produites par d'autres types cellulaires ; (2) les lymphocytes synoviaux sont des cellules peu actives présentes en faible nombre pendant la phase de multiplication avec des marqueurs d'activation tardifs ; (3) l'absence d'oligoclonalité des LT dans la synoviale rhumatoïde ; (4) la destruction paraît souvent peu dépendante de la présence des cellules T et enfin, la déplétion par des anticorps monoclonaux anti-CD4 n'est pas toujours efficace en pratique clinique (Boissier *et al.*, 2002). Les LT synoviaux sont pour la plupart des cellules CD4⁺ de type Th1 produisant de l'IFN- α et de l'IL-2. Un autre sous-type de LT CD4⁺, les lymphocytes Th17, a également montré son importance dans la pathogénie de la PR au point que le concept d'une maladie de type Th1 soit remis en cause. La production d'IL-17 est la seule signature de ces lymphocytes Th17 dont l'influence sur la biologie des ostéoclastes a été démontrée. En effet, les lymphocytes Th17 produisent du RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) et du TNF- α qui agissent directement sur les précurseurs d'ostéoclastes pour les engager dans un processus de différenciation. De plus, l'IL-17 induit l'expression de RANKL par les fibroblastes synoviaux et les ostéoblastes ce qui permet à ces Th17 de contrôler indirectement la résorption osseuse. La découverte de l'IL-17 et des contrôles direct et indirect qu'elle exerce sur le processus rhumatoïde a entraîné une redéfinition de la PR,

qui n'est plus alors considérée comme une maladie de type Th1 mais plutôt comme une maladie Th1/Th17 (Weyand *et al.*, 2015).

1.3. Médiateurs de l'inflammation

Le dysfonctionnement des différentes cellules de l'immunité observé au cours de la PR est certainement une conséquence d'un déséquilibre de la production de certains facteurs qui donne lieu à la surexpression ou à la suppression d'autres facteurs, notamment des anticorps, des cytokines, des chimiokines et des métalloprotéases. Tous ces facteurs constituent un réseau qui contribue aux caractères systémique et chronique de la PR.

1.3.1 Auto-anticorps

Des études réalisées chez les rongeurs ont montré que des anticorps spécifiques dirigés contre des auto-antigènes sont directement impliqués dans la pathologie de la PR et contribuent au caractère auto-immun de cette pathologie ; ils sont appelés auto-anticorps. Le plus documenté de ces auto-anticorps reste le facteur rhumatoïde (FR) mais on retrouve également les auto-anticorps dirigés contre les protéines citrullinées (ACPA ou Anti-Citrullinated Protein Antibodies), les autoanticorps anti-nucléaires (ANA ou Anti-Nuclear Antibodies) dirigés contre les acides nucléiques, les auto-anticorps anti-collagène de type II (anti-CII) et les anticorps anti-Glucose-6-Phosphate Isomérase (anti-GPI):

- **Facteur rhumatoïde (FR)** : il a été identifié en 1949 comme un auto-anticorps appartenant à la famille des Immunoglobulines M (IgM) dirigé contre la région constante des IgG autologues. Ce facteur est exprimé dans 60-85% des cas de PR. Il est établi qu'un taux sérologique élevé de FR est corrélé à l'aggravation des signes cliniques et témoigne donc de la sévérité de la maladie (Tighe *et al.*, 1995). Ce facteur a été identifié dans plusieurs modèles murins d'arthrite et comme

pour la PR humaine, il est préférentiellement dirigé contre les IgG autologues ce qui confirme que cet anticorps est produit en réponse à un antigène endogène (Vencovsky *et al.*, 2003).

- **ACPA** : le déterminant antigénique de ces anticorps est l'acide aminé citrulliné obtenu par désimination de l'arginine par l'enzyme Peptidyl-Arginine Désiminase (PAD), (Vossenaar *et al.*, 2003). Le processus de citrullination des protéines synoviales a été identifié dans le modèle d'arthrite aiguë induite par *Streptococcus pyrogenes* et dans le modèle d'arthrite chronique induite au collagène. Les protéines citrullinées ont également été identifiées dans la membrane synoviale de patients atteints de PR. Une méta-analyse a démontré que les auto-anticorps anti-CCP sont plus spécifiques de la PR que le FR. D'ailleurs, ces auto-anticorps ont été retrouvés chez des donneurs de sang plusieurs années avant l'apparition des premiers signes cliniques de PR et dans les modèles animaux, le transfert de ces auto-anticorps accentue la sévérité de l'arthrite, ce qui souligne leur rôle effecteur. Depuis longtemps, des tests ELISA ont été développés pour détecter la présence des ACPA dans le sérum de patients et ont montré une grande performance dans le diagnostic de la maladie (Cordonnier *et al.*, 1996).

- **Anticorps anti-nucléaires (ANA)** : ces auto-anticorps représentent un groupe hétérogène d'anticorps dirigés contre des fragments d'acides nucléiques. L'anti-RA33 est un auto-anticorps qui présente un intérêt particulier dans la PR. Dirigé contre la protéine A2 (33kDa), il est retrouvé dans 30% des cas de PR. Cependant, ces auto-anticorps restent moins spécifiques que le FR ou les anti-CCP et leur expression n'est pas corrélée avec le caractère érosif de la pathologie. En effet, les patients qui sont séropositifs pour ces auto-anticorps uniquement ne développent pas une PR agressive. L'anti-RA33 est également détecté dans plusieurs modèles d'arthrite expérimentale, spécifiquement chez le rat où il apparaît avant le déclenchement des signes cliniques (Edwards, 2016).

- **Anticorps anti-CII** : le collagène de type II est un constituant majeur du cartilage. Les auto-anticorps anti-CII ont été identifiés chez les patients atteints de PR sous leurs formes native et dénaturée (Cho *et al.*, 2007) . Cependant, la prévalence de ces auto-anticorps reste incertaine. En effet, la multiplicité des techniques de détection rend les résultats très disparates ce qui ne permet pas à ces auto-anticorps de constituer un marqueur de diagnostic ou d'activité de la PR. En revanche, pour les modèles animaux, la situation est beaucoup plus claire. Le modèle d'arthrite induite au collagène résulte d'une réponse immune au collagène de type II (Matsumoto *et al.*, 1999).
- **Anticorps anti-GPI** : les auto-anticorps dirigés contre cette enzyme ont été identifiés chez les souris K/BxN. Ces auto-anticorps sont eux-mêmes arthritogéniques puisque le transfert passif du sérum de souris K/BxN à des souris normales induit une réponse auto-immune anti-GPI et une arthrite sévère. Cependant, très peu d'études ont réussi à déterminer une forte prévalence de ces autoanticorps chez les patients atteints de PR (Brennan et Innes, 2008).

1.3.2. Cytokines et chimiokines

1.3.2.1. Cytokines pro-inflammatoires

- **Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)** : ce médiateur classique de l'inflammation a été identifié comme une cytokine clé de la PR. Exprimé par les macrophages activés, les LT et les synoviocytes de la membrane synoviale, il régule directement le recrutement des ostéoclastes précurseurs et augmente l'expression de RANK par ces cellules. Le TNF- α module également la différenciation et la fonction des ostéoblastes en régulant l'expression de Runx2, facteur de transcription spécifique aux ostéoblastes (Kuroki *et al.*,1994). En effet, *in vitro*, il réduit l'expression de l'ARNm de la phosphatase alcaline, du collagène de type I et de l'ostéocalcine. De plus, les taux élevés de TNF- α retrouvés chez les patients atteints de PR sont souvent corrélés à une phase active de la maladie. L'importance de cette cytokine dans la

pathogénie de la PR a entraîné le développement d'anticorps monoclonaux (Infliximab, Adalimumab) et de protéines de fusion (Etanercept, protéines formées par la fusion du domaine de liaison du TNFRII avec le domaine Fc de l'IgG), utilisés aujourd'hui comme traitements de la PR (Cantagrel *et al.*, 2017)

- **IL-1** : cest une cytokine ayant 2 formes α et β , produite par les macrophages activés et les fibroblastes de la membrane synoviale. Induite par le TNF- α , elle permet l'expression des métalloprotéases et du RANKL dans le tissu synovial favorisant ainsi la résorption osseuse (Ji *et al.*, 2002). Il a été montré que les souris déficientes en IL-1 sont totalement protégées de l'arthrite alors que les souris déficientes en TNF- α ne le sont que partiellement ce qui prouve l'importance de cette cytokine dans la pathogénie de la PR. L'IL-1 β est la seule forme qui permet l'induction de l'inflammation. En effet, les souris IL-1 $\beta^{-/-}$ ou IL-1 $\alpha/\beta^{-/-}$ ne répondent pas à l'induction de fièvre par la térébenthine alors que les souris IL-1- $\alpha^{-/-}$ répondent à cette induction. Bien que l'importance de l'IL-1 ait été largement démontrée, chez les patients atteints de PR, l'utilisation de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra) sous forme recombinante (Anakinra) a montré des propriétés anti-inflammatoires limitées (Cantagrel *et al.*, 2017)
- **IL-6** : l'action de l'IL-6 dans la membrane synoviale rhumatoïde se fait de concert avec le TNF- α et il est difficile de séparer l'une de l'autre : activation des cellules de l'immunité, activation des cellules endothéliales et des synoviocytes, activation des ostéoclastes, induction des protéines de l'inflammation. L'IL-6 est présente à des taux élevés dans le sérum et le liquide articulaire des patients souffrant de PR. Ses taux sériques sont corrélés à l'activité de la maladie (Hunter et Jones, 2015).
- **IFN- γ** : plusieurs études ont classé la PR comme une maladie à prédominance Th1 associée à une surexpression d'IFN- γ par les LT auto-réactifs. Cette classification découle surtout de

l'étude du modèle d'arthrite induite par le collagène où l'administration de l'IFN- γ augmente l'incidence et la sévérité de la maladie. Par contre, dans le modèle d'arthrite induite par le protéoglycane, c'est l'effet inverse qui se produit. Ainsi, le paradoxe lié à la signalisation induite par l'IFN- γ rend les applications thérapeutiques basées sur le rôle de cette cytokine assez complexes (Kaplan *et al.*, 2002).

- **Autres cytokines** : d'autres cytokines dépendantes ou non de l'expression de celles précédemment citées sont impliquées dans la pathogénie de la PR mais aucune preuve n'a jusqu'à lors été apportée quant à leur rôle central. Parmi ces cytokines, on retrouve l'IL-2, 7, 9, 15 et 21. Elles sont retrouvées dans la membrane synoviale de patients atteints de PR. Par ailleurs, l'IL-18 identifiée d'abord comme un inducteur de l'IFN- γ présente également une activité pro-inflammatoire au sein de la membrane synoviale et contribue à l'accélération de l'athérosclérose chez les patients atteints de PR (Isenberg *et al.*, 2016).

1.3.2.2. Cytokines anti-inflammatoires

En réponse à l'activation des cellules de l'immunité et aux cytokines pro-inflammatoires produites, des mécanismes anti-inflammatoires tentent de contrôler ce processus d'auto-réactivité installé dans les articulations. Ces mécanismes anti-inflammatoires sont gérés par des cytokines, dites de type Th2, parmi lesquelles on retrouve :

- **IL-4** : il a été montré que cette cytokine est présente à des quantités très faibles dans le liquide synovial de patients atteints de PR. Ce manque en IL-4 contribue au déséquilibre des médiateurs de l'inflammation chez les patients atteints de PR. *In vitro*, l'IL-4 inhibe la formation d'ostéoclastes en bloquant de manière irréversible et STAT6-dépendante la voie RANK-RANKL. La thérapie génique par l'IL-4 de l'arthrite induite au collagène chez la souris a permis de montrer le rôle protecteur de cette cytokine *in vivo* contre la destruction

cartilagineuse. En effet, l'IL-4 inhibe l'expression d'IL-6 et d'IL-17 et prévient ainsi la libération de collagène par les métalloprotéases activées (Lubberts *et al.*, 2000).

- **IL-10** : plusieurs modèles animaux ont permis de démontrer l'efficacité d'un traitement par l'IL-10 dans la réduction de l'inflammation et de l'infiltration cellulaire ainsi que dans la destruction articulaire au cours de l'arthrite. En effet, elle inhibe l'expression de l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α . Une étude réalisée en *ex vivo* sur des LT CD4⁺ de patients atteints de PR a permis de montrer que l'IL-10 supprime les lymphocytes Th17 et stimule les lymphocytes Treg CD4⁺/CD25⁺. Cependant, le traitement de patients atteints de PR pendant 28 jours par l'IL-10 a plutôt montré des résultats décourageants en termes d'efficacité (Schulze-Koops et Kalden, 2001).
- **IL-13** : il s'agit d'une cytokine dite IL-4-like en raison de leurs homologies structurales et fonctionnelle. En effet, tout comme l'IL-4, l'IL-13 présente une activité inhibitrice sur les fonctions monocytaires. Dans le modèle d'arthrite induite au collagène, le traitement par cette cytokine inhibe l'expression de l'IL-17 (Hueber *et al.*, 2010). Une étude réalisée sur un modèle d'arthrite chez le rat a montré que l'IL-13 inhibe l'expression des métalloprotéases 2 et 9, ce qui lui confère des propriétés anti-angiogéniques (Haas *et al.*, 2007).

1.3.2.3. Chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines spécifiques du chimiotactisme qui aident les leucocytes à migrer à travers la barrière endothéliale et à atteindre le tissu synovial ce qui permet d'initier et d'entretenir l'arthrite. Cette famille de cytokines est constituée de 4 groupes classés selon la position de leurs résidus cystéines : les C-X-C, les C-C, les C et les C-X-C₃. Le rôle des 2 derniers groupes ne paraît pas très important dans la pathogénie de la PR, hormis peut-être la lymphotactine, une chimiokine qui active les LT, les macrophages et les fibroblastes. Appartenant aux C chimiokines et majoritairement produite par les LT CD8⁺ et T CD4⁺, elle

inhibe l'expression de certaines métalloprotéases par les fibroblastes synoviaux (Blaschke *et al.*, 2003). Parmi les C-X-C-chimiokines impliquées dans la pathogénie de la PR, on trouve l'IL-8, ENA-78, Gro- α , Gro- β et CTAP-3. Abondamment présentes dans le liquide synovial et le sérum de patients atteints de PR en comparaison avec d'autres rhumatismes inflammatoires, elles sont chimio-attractives pour la plupart des cellules immunitaires mais préférentiellement pour les neutrophiles et possèdent des propriétés pro-angiogéniques. Parmi les C-C-chimiokines, on retrouve MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein -1) et RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted). Plus spécifiques du recrutement des macrophages que les C-X-C-chimiokines, elles sont détectées aux sites présentant des infiltrats extensifs et dans le sang périphérique des patients atteints de PR. Les interactions entre ces familles de chimiokines et les cytokines des voies Th1, Th17 et Th2 permettent de perpétuer l'inflammation au niveau des articulations ce qui contribue au caractère chronique de la PR (Szekanecz *et al.*, 1998).

1.3.3. Métalloprotéases

Les métalloprotéases ou MMPs (Matrix Metalloproteinases) appartiennent à la famille des endopeptidases. Elles sont capables de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire dont le collagène, le protéoglycane, la fibronectine et la laminine (Takizawa *et al.*, 2000). Au cours de la PR, la destruction du cartilage articulaire est causée par certaines de ces métalloprotéases dérivées à la fois de la synovite et des chondrocytes stimulés, cellules formant le cartilage. Ces cellules surexpriment les MMP-1, 3, et 9. D'autres cellules participent également à ce processus : les fibroblastes produisent MMP-2, les neutrophiles sécrètent quant à eux les MMP-8 et MMP-9 alors que les macrophages produisent les MMP-1 et 9. Toutes ces MMPs sont sécrétées dans la cavité articulaire où elles attaquent la surface du cartilage immergée dans le liquide synovial. Parmi elles, la MMP-3 est une collagénase particulièrement augmentée dans le liquide synovial de patients atteints de PR et sa détection dans le sérum semble prédire le niveau de destruction

articulaire (Yamanaka *et al.*, 2000). Cependant, dans le modèle d'arthrite induite au collagène, aucune différence significative n'a été notée chez les souris. Une autre MMP semble jouer un rôle primordial dans la destruction articulaire : il s'agit de la MMP-9, une gélatinase fortement exprimée par les ostéoclastes et particulièrement localisée dans le cartilage calcifié. Des quantités élevées de proMMP-9, forme inactive de la MMP-9, ont été retrouvées dans le sérum et le liquide synovial de patients atteints de PR en comparaison avec des donneurs sains. Un marquage abondant de cette protéase a été également retrouvé dans les vaisseaux sanguins à proximité de la membrane synoviale, indiquant vraisemblablement une activité pro-angiogénique (Gruber *et al.*, 1996). Des inhibiteurs de ces MMPs, appelés TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases), sont également sécrétés par les mêmes cellules de l'infiltrat inflammatoire qui sécrètent les MMPs, mais il a été montré que dans le liquide synovial rhumatoïde, le ratio MMPs / TIMPs est augmenté (Yoshihara *et al.*, 2000).

Chapitre 2 :Radicaux libres et stress oxydatif

La recherche sur la capacité antioxydante représente un enjeu scientifique important ; notion largement relatée dans l'étude des propriétés biologiques. Au travers du chapitre suivant, nous allons présenter les molécules responsables de l'oxydation et celles qui permettent de la combattre.

1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique (Camille et Mireille., 2011). La molécule d'oxygène (ou dioxygène, O₂) présente la particularité d'avoir la structure d'un biradical libre, en raison de ses deux électrons célibataires situés sur les deux orbitales de plus grande énergie. Dans les phénomènes de stress oxydant prenant place dans les milieux biologiques, les radicaux libres qui interviennent, partagent pour caractéristique celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène ou d'azote. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS : reactive oxygen species) ou de l'azote (EAR ou RNS : reactive nitrogen species), (Wolff.1993). La figure 5 présente les différentes ERO et leurs origines.

1.1. Espèces réactives de l'oxygène

On distingue deux grands groupes de molécules réactives impliquées dans le stress oxydant: les espèces radicalaires et les espèces non-radicalaires. La réactivité varie d'un radical à un autre et dépend de l'environnement où ils se trouvent. Leurs constantes de vitesse réactionnelle sont très élevées de l'ordre de 10⁵ à 10¹⁰ mol⁻¹.L.s⁻¹ (Delattre *et al.*, 2005).

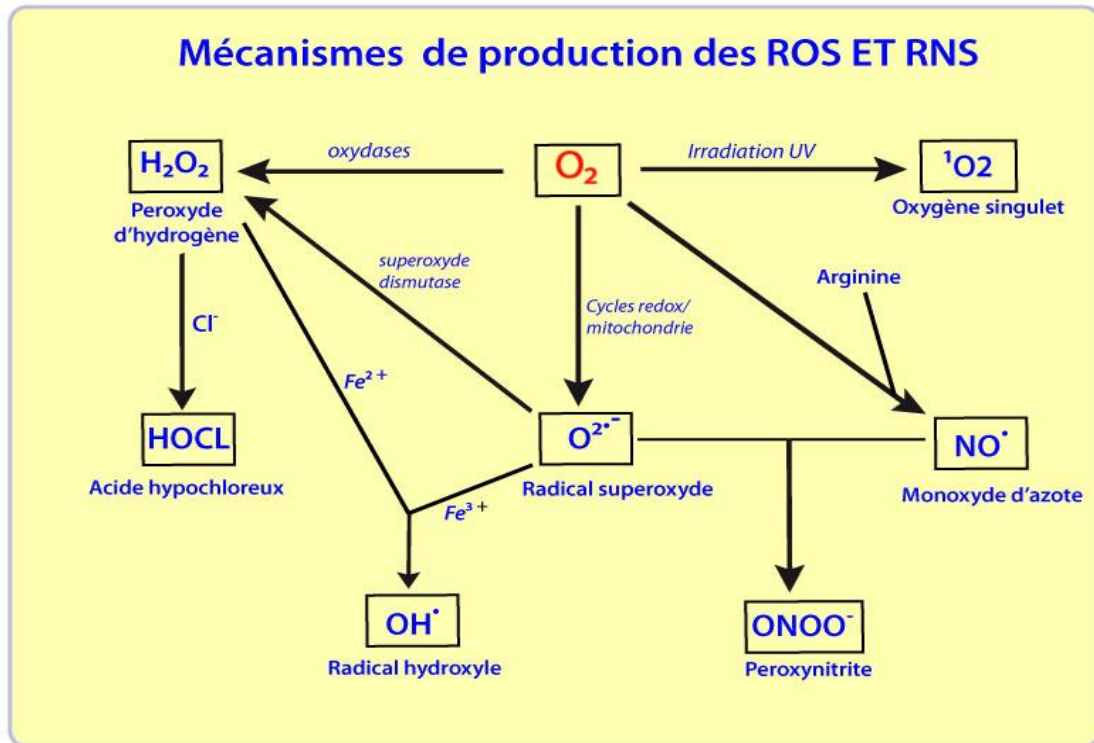


Figure 5 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

1.1.1. ROS radicalaires

L'anion radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est le résultat de l'apport d'un électron supplémentaire à la structure initiale de l'oxygène. Malgré une réactivité moyenne, ce radical a quelques cibles privilégiées telles que le cytochrome c (Fe^{3+}), l'ascorbate et surtout la superoxyde dismutase. Plus réactif que le précédent, le radical perhydroxyle HO_2^{\bullet} est obtenu après protonation de ce dernier à pH inférieur à 4,8. La réduction mono électronique du H_2O_2 donne naissance au radical HO^{\bullet} et à l'anion basique non radicalaire OH^- en présence d'un catalyseur, le Fe^{2+} (réaction de Fenton : $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + Fe^{3+} OH^-$). Cette espèce chimique particulièrement réactive joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et la destruction du matériel génétique (Hennebelle, 2006).

Le radical peroxyde RO_2^{\bullet} est un radical secondaire issu de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centrés sur le radical R^{\bullet} . Sa réactivité se situe entre l'anion radical superoxyde et le radical hydroxyle. Le radical secondaire alkoxyde RO^{\bullet} est produit suite à la décomposition de l'hydroperoxyde RO_2H , issu de l'oxydation du substrat RH (Droge, 2016).

1.1.2. ROS non radicalaires

L'oxygène singulet 1O_2 , qui est la forme diamagnétique de l'oxygène, est produit en présence de rayonnement UV ou par les leucocytes. Bien qu'il ne soit pas un radical, il joue un rôle dans le vieillissement cutané et certaines maladies liées à l'âge (Choe et Min, 2005). Le H_2O_2 peroxyde d'hydrogène est également toxique, en particulier à cause de sa transformation en radical hydroxyle en présence de cations métalliques Fe^{2+} et Cu^+ , lors de réactions de type « Fenton » (Wardman et Candeias, 1996). La myéloperoxydase convertit le peroxyde d'hydrogène en acide hypochlorique ($HOCl$) à des concentrations physiologiques. Ce dernier peut réagir avec les fonctions amines des protéines pour former des chloramines (Martinez, 2004).

1.2. Espèces azotées réactives

1.2.1. Espèces azotées radicalaires

Le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) a pris une place considérable en biologie. Malgré son rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydant en limitant la lipoperoxydation et ses effets anti-inflammatoires, il est paradoxalement impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le diabète, l'athérosclérose, le cancer et les lésions neuronales dégénératives.

1.2.2. Espèces azotées non radicalaires

Caractérisé par sa grande faculté de diffusion dans les membranes cellulaires et sa réactivité moyenne (de l'ordre de quelques secondes *in vivo*), le monoxyde d'azote radicalaire peut aisément réagir avec la plupart des espèces oxygénées et se transformer en dioxyde d'azote (NO_2) lequel peut donner du trioxyde d'azote (N_2O_3) pour enfin aboutir à un ion nitrate stable (NO_2^-). De plus, le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxynitrite (ONOO^-) moins réactif que son précurseur azoté, mais responsable de l'oxydation de nombreuses biomolécules (protéines, lipides et acides nucléiques), (Droge,2016)

1.3. Production de radicaux libres

1.3.1. Production intracellulaire

La production des ERO dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles (Figure 6) mais est essentiellement d'origine enzymatique. Il s'agit principalement de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique mitochondrial de la chaîne respiratoire (Mazat et Ransac.,2010).

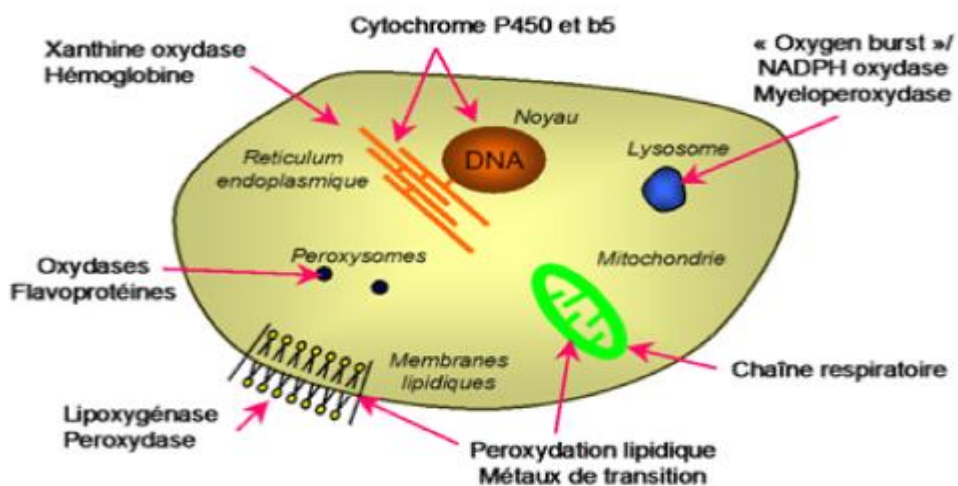
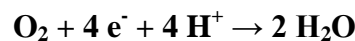


Figure 6 : Sites de production intracellulaire des ERO (Moure *et al.*, 2001).

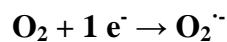
La NAD(P)H oxydase est une enzyme membranaire qui catalyse la réduction de l'oxygène selon la réaction :



Les cytochromes P₄₅₀, accepteurs terminaux d'électrons du complexe (IV) de la chaîne de transport des électrons, situés dans la membrane mitochondriale, catalysent la réaction :



Cette chaîne de transport laisse fuir une certaine proportion d'électrons, environ 2 %, qui vont réduire partiellement l'oxygène pour aboutir à la formation du radical superoxyde :



Compte tenu de l'intense activité de la chaîne respiratoire dans les organismes aérobies, cette fuite d'électrons semble devancer les activités de la NAD(P)H. De plus, dans les mitochondries, l'oxydation de coenzymes, telles que les flavoprotéines réduites, s'accompagne d'une perte de protons et d'électrons qui, par l'intermédiaire de la chaîne de transport, sont ensuite transférés à l'O₂. La chaîne de transport des électrons est composée de nombreuses espèces moléculaires et ioniques (les flavoprotéines, plusieurs cytochromes etc...), (Sohal *et al.*, 2015). D'autres sources peuvent également jouer un rôle dans la production de radicaux comme la xanthine oxydase qui réduit l'oxygène moléculaire en ion superoxyde, les peroxysomes qui possèdent plusieurs enzymes sources de peroxyde d'hydrogène et les lipo-oxygénases, enzymes de la voie de l'acide arachidonique qui permettent notamment la synthèse des prostaglandines, oxydent les acides gras pour donner des hydroperoxydes d'acide gras insaturés (Delattre *et al.*, 2005).

Par ailleurs, au cours de la défense antibactérienne, les cellules phagocytaires activées par une réaction inflammatoire vont produire un grand nombre de ROS. De plus, il y a production

massive d'anion superoxyde par le mécanisme leucocytaire ; c'est la flambée respiratoire. Les NO synthases, à l'origine du radical NO[•], peuvent, sous certaines conditions produire des anions superoxydes (Valko *et al.*, 2006).

1.3.2. Production extracellulaire

L'environnement et le mode de vie sont également responsables de la création et de l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme. Les facteurs environnementaux incluant des agents cancérogènes non-génotoxiques peuvent directement, ou indirectement, être impliqués dans la génération de radicaux libres (xénobiotiques, activation des leucocytes..). Les rayonnements UV induisent la synthèse de O₂^{•-}, OH[•], ¹O₂ et d'H₂O₂ (John, 2014).

L'oxyde d'azote et le dioxyde d'azote présents dans le mode de vie (tabagisme, radiations ionisantes, champs électriques, polluants industriels..), ainsi qu'une alimentation « chimiquée » (raffinée, riche en graisses saturées et en sucre, consommation d'alcool...), sont autant d'éléments favorisant la genèse de radicaux libres (John, 2014).

1.4. Rôles des ROS

Les ROS sont connues pour jouer un double rôle dans les systèmes biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants (Valko *et al.*, 2004) :

- Bénéfiques, un grand nombre de fonctions physiologiques sont sous le contrôle des ROS et de leurs effets activateurs/régulateurs dans les voies de signalisation. De nombreux ligands peuvent être à l'origine d'une production des ROS : des facteurs de croissance comme le PDGF (platelet-derived growth factor) ou l'EGF (epidermal growth factor), des cytokines telles que l'INF α (interféron γ) ou le TNF α (tumor necrosis factor α) et des peptides comme l'angiotensine II. Ces ligands se fixent à leurs récepteurs spécifiques (récepteurs des cytokines, récepteurs à activité

tyrosine kinase, sérine/ thréonine kinase, récepteurs couplés aux protéines G ou à des canaux ioniques) et induisent des ROS qui participent alors à la transduction et à l'amplification du signal (Dröge, 2016). Les ROS amplifient et/ou induisent les signaux intracellulaires par modification de l'équilibre rédox intracellulaire (équilibre GSH/ GSSG et thiorédoxine capable de moduler le signal rédox intracellulaire) et par modification oxydative des protéines. Par exemple, dans les cellules musculaires lisses, le PDGF induit une production transitoire d' H_2O_2 et d' O_2^{\bullet} qui entraîne l'activation des voies de signalisation ROS dépendantes comme les MAPK, NF- κ B et JAK/STAT (Janus kinase/ signal transducer and activator of transcription), responsables de l'activité mitogène du PDGF (platelet-derived growth factor), (Jay, 2008).

Ainsi, parmi les fonctions physiologiques à composante radicalaire, on peut citer : la régulation du tonus vasculaire, la relaxation du muscle lisse, l'adhésion plaquettaire, la régulation des fonctions contrôlées par la concentration en oxygène et l'apoptose (Dröge, 2016). L'exemple le plus pertinent du rôle physiologique des ROS est celui de la défense antimicrobienne (bactéricidie dépendante de l'oxygène) qui fait intervenir trois systèmes enzymatiques pour la formation de ROS (Stasia, 2007).

- Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ROS et RNS et les systèmes de défense, avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (atteintes d'ADN, protéines, lipides). Par ailleurs, bien que les ROS participent à de nombreuses fonctions physiologiques, elles contribuent également à la pathogenèse d'un grand nombre de maladies comme le diabète sucré, les maladies cardiaques et neurodégénératives, les pathologies articulaires, le cancer, le vieillissement (Von Hoff *et al.*, 1997 ; Varthaman *et al.*, 2008).

Un exemple établi des maladies cardiaque chez les patients atteints de cancer et traités par la doxorubicine (DOX) où on assiste à la mort des cellules cardiaques. Bien que les mécanismes moléculaires responsables de cette mort des cellules cardiaques restent encore controversés (de très nombreuses voies de signalisation ont été décrites), l'induction d'un stress oxydant par la

DOX est la principale et la plus répandue des hypothèses (Simunek *et al.*, 2009). Cette production de ROS s'explique notamment par la structure de la DOX qui contient une quinone capable de subir un cycle rédox, entraînant la formation d' $O_2^{\cdot-}$, et en présence de fer catalyse la formation d' $\cdot OH$ (Myers. 1998). Ces ROS vont alors s'attaquer aux membranes des cardiomyocytes, déclenchant des réactions de peroxydation lipidique. Cette toxicité de la DOX est indépendante de ses effets antitumoraux. Ceci laisse présager le développement d'agents cardioprotecteurs qui préviendraient les effets néfastes de la DOX sans affecter ses propriétés anticancéreuses (Ludke *et al.*, 2009).

2. Stress oxydant

Les ROS sont présentes dans la cellule à des doses raisonnables : leur concentration est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants (Halliwell et Gutteridge.,1999). Ainsi, à l'état quiescent, on dit que la balance antioxydants/ pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre. Cependant cette homéostasie rédox peut être rompue, soit par une production excessive d'ERO (comme dans le vieillissement ou l'athérosclérose), soit par une diminution des capacités antioxydantes (comme chez les personnes souffrant d'obésité et les fumeurs). On parle alors de stress oxydant. Un tel déséquilibre peut être provoqué de façon régulée par l'activation de systèmes de production d'ERO. La réponse antioxydante est alors efficace pour compenser cette production et le déséquilibre est transitoire. En revanche, dans certaines situations pathologiques (cancer), la production d'ERO est plus importante et prolongée, et la réponse antioxydante insuffisante. Le déséquilibre est durable. Cette rupture de l'homéostasie rédox peut avoir plusieurs origines : stress d'origine exogène (agents environnementaux pro-oxydants), intoxication aux métaux lourds, irradiations, carence en antioxydants apportés par l'alimentation ou anomalies génétiques (Delattre *et al.*, 2005).

3. Pouvoir antioxydant

L'organisme est capable, dans une certaine mesure, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense enzymatiques et chimiques (Hennebelle, 2006). Les molécules ou microconstituants capables d'interférer avec les radicaux libres sont appelés antioxydants. Un bon antioxydant se devra de respecter quelques critères (Valko *et al.*, 2006) :

- Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres
- Chélater des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^+) d'importance biologique capables de promouvoir la production de radicaux libres par la réaction de Fenton
- Avoir un effet positif sur l'expression génique
- Être rapidement absorbé
- Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques
- Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire.

3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants (Figure 7) les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Sharma *et al.*, 2012). Le rôle majeur de la superoxyde dismutase (SOD) est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. La catalase, essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. L'activité de la glutathion peroxydase, ou GPx, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres

hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (Mariani *et al.*, 2014).

D'autres enzymes jouent un rôle non négligeable dans la lutte antioxydante, l'ensemble formant un système complexe : glutathion réductase, thioredoxine reductase, glutathion transferase... (Atkin *et al.*, 2005).

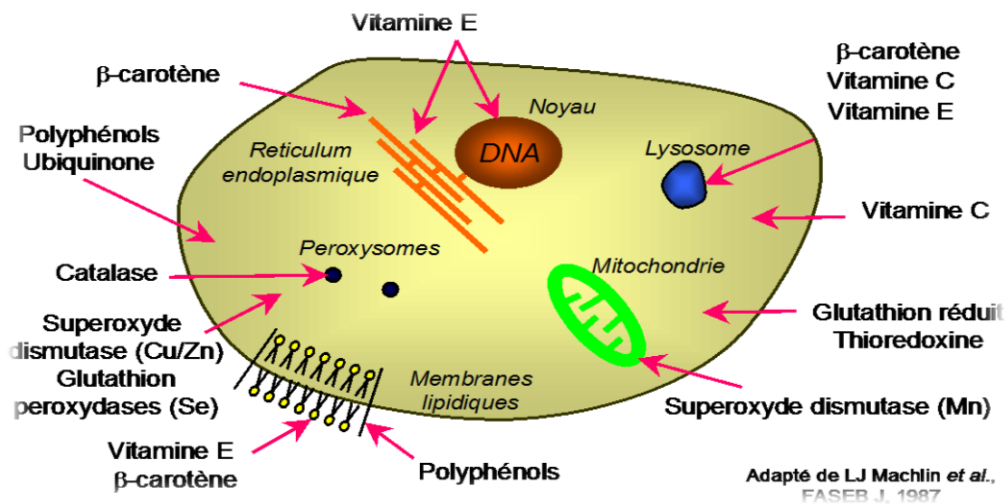


Figure 7: Schémat des molécules intervenant dans les protections cellulaires (Moure *et al.*, 2001)

3.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques

3.2.1. Systèmes antioxydants endogènes

Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir, *in vitro*, avec les radicaux HO^\bullet , RO_2^\bullet , RO^\bullet , $^1\text{O}_2$, ONOO^- , des radicaux centrés sur le carbone, mais aussi l'acide hypochloreux HOCl (Selvaraj *et al.*, 2006).

Le glutathion est aussi capable de participer à l'activité enzymatique qui, elle déttoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes (Masella *et al.*, 2005). Les formes oxydées et réduites de l'acide lipoïque, autre composé appartenant aux thiols, présentent des propriétés

antioxydantes *in vitro* en piégeant les HO[•], RO₂[•], l'HOCl et l'IO₂, en se liant à des métaux comme le fer et le cuivre, il permet de les désactiver d'un point de vue catalytique, et possède la capacité de régénérer certains antioxydants endogènes et exogènes (Panfili *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004).

L'acide urique, présent sous forme urate à pH physiologique, possède des propriétés antioxydantes contre les HO[•] et RO₂[•], tout comme la bilirubine, les mélanines et la mélatonine (Delattre *et al.*, 2005).

3.2.2. Systèmes antioxydants exogènes

Les antioxydants chimiques exogènes (Figure 8), comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (McCall et Frei, 1999). La vitamine C ou acide ascorbique est une molécule hydrosoluble présente dans la plupart des fruits et légumes (non synthétisée par l'Homme). Elle est connue pour son action protectrice contre l'oxydation membranaire. Son caractère antioxydant provient de sa forme ionisée abondante (AscH⁻) qui peut aisément réagir avec des radicaux et produire le radical ascorbate tricarbonyle (AscH[•]), stabilisé par résonance. Du fait de son très faible pK, la forme non protonée radicalaire faiblement réactive est privilégiée (Asc^{•-}), (Valko *et al.*, 2006). Paradoxalement, les études *in vivo* de la supplémentation en vitamine C montrent, pour la plupart, une réduction de l'oxydation de l'ADN, des protéines et de la lipoperoxydation, alors que certains auteurs relatent l'effet pro-oxydant *in vitro* de cette molécule dans des milieux tamponnés contenant du fer en accélérant la réaction de Fenton (Valko *et al.*, 2006).

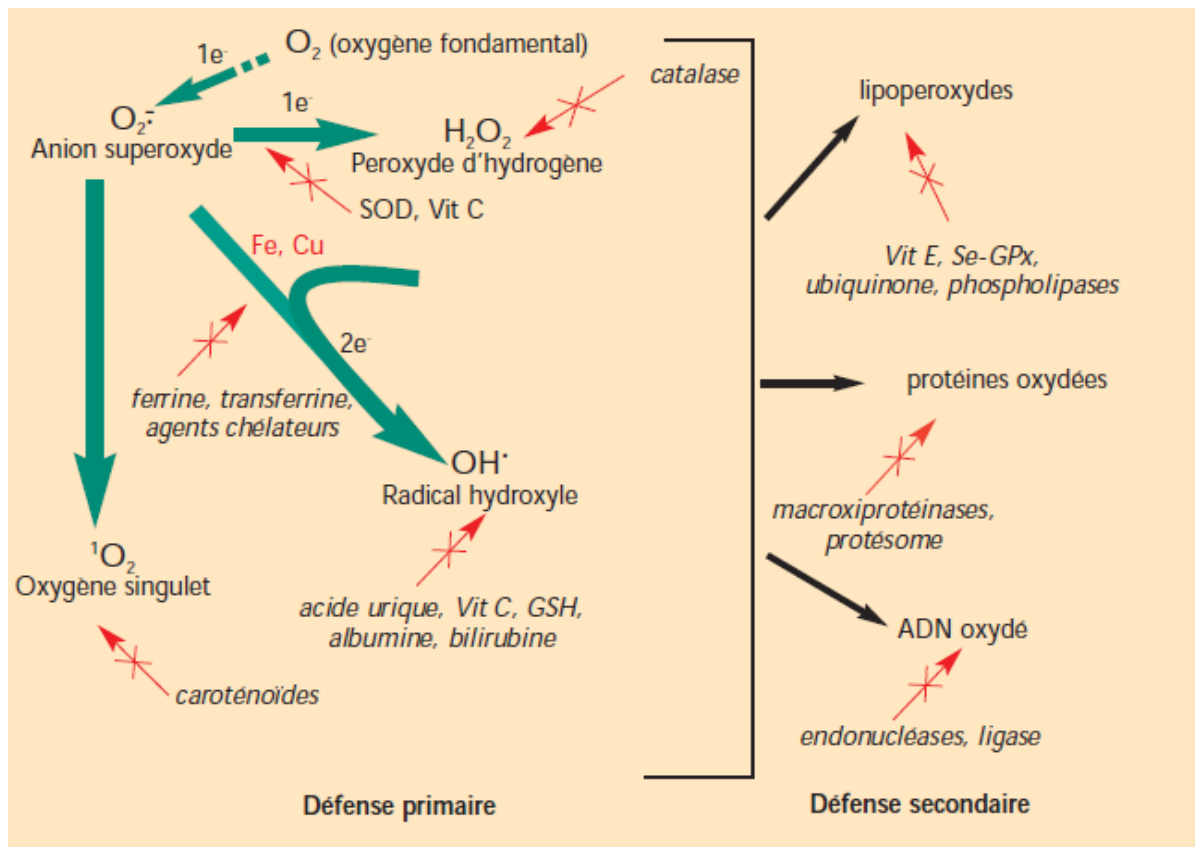
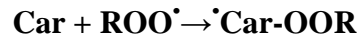
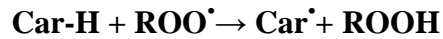
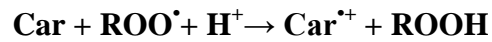


Figure 8 : Régulation de la production des espèces oxygénées activées (EOA) par des systèmes antioxydants de défenses primaire et secondaire (Léger, 2006)

La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (ensemble de 8 molécules dont 4 tocophérols et 4 tocotriénols). Ce sont de bons antioxydants alimentaires. Elles préviennent l'apparition d'hydroperoxydes en piégeant les radicaux LOO^{\cdot} (Packer, 2015). De plus, il faut noter que la vitamine C associée à la vitamine E régénère la forme réduite de l' α -tocophérol par une réaction de transfert d'hydrogène.

Les caroténoïdes sont des pigments issus des plantes et microorganismes, et sont regroupés en deux grandes familles : les carotènes et les xanthophylles. On en dénombre environ 600 présents dans la nature (Léger, 2006). L'activité antioxydante de ceux-ci est liée à leur longue chaîne polyénique qui leur permet de réagir avec les radicaux ROO^{\cdot} , HO^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$, R^{\cdot} par

simple addition électrophile et transfert d'électron. Ils permettent, en particulier, de neutraliser l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Valko *et al.*, 2006).



Les composés phénoliques, et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (Leopoldini *et al.*, 2011).

De façon générale, l'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants, en particulier du nombre de groupements hydroxyles (Schroeter *et al.*, 2002).

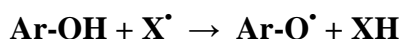
Les composés phénoliques exercent une activité antioxydante via plusieurs mécanismes:

- Le piégeage direct des ERO ;
- L'inhibition des enzymes génératrices d'EOR ;
- La chélation des ions de métaux de transitions, responsables de la production des ERO ;
- L'induction de la biosynthèse d'enzymes antioxydantes (Halliwell, 1994).

➤ Piégeage des radicaux libres

La réduction de divers radicaux par les polyphénols a été beaucoup étudiée afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox (Jovanovic *et al.*, 1994), les polyphénols (Ar-OH), sont capables de réduire rapidement les

radicaux libres oxydants comme le superoxyde, les peroxydes (ROO•), les alkoxydes (RO•) et l'hydroxyle par transfert d'hydrogène .



Où

X[•] : Représente l'une des ERO mentionnées ci-dessus ;

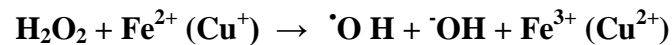
Ar-O[•]: radical aryloxyde qui, s'il s'agit d'un noyau catéchol, peut réagir avec un autre radical pour former une *o*-quinone plus stable.

L'efficacité de la conversion d'un phénol (ArOH) en le radical aryloxyde (ArO[•]) correspondant reflète la stabilité de ce dernier et peut être quantifiée par des paramètres expérimentaux et théoriques tels que l'énergie de la dissociation de liaison (EDL) du groupement OH, le potentiel redox du couple ArOH/ArO[•], les constantes de vitesse de la réduction des ERO généralement déduites à partir d'expériences de radiolyse pulsée (Leopoldini *et al.*, 2011 ; Fiorucci *et al.*, 2007) et les constantes de vitesse pour la réduction de radicaux colorés stables tels que le DPPH (Goupy *et al.*, 2003). De nombreuses études ont établi des relations entre la structure des polyphénols et leur capacité à piéger les radicaux libres (Goupy *et al.*, 2003 ; Pietta, 2000). De ces données, il ressort que la présence d'un groupement catéchol (*ortho*-diphénol ou 1,2-dihydroxybenzène) est le déterminant majeur de l'activité redox des polyphénols. En effet, le radical correspondant, de type *ortho*-semiquinone, est relativement stable grâce à une délocalisation des électrons et une stabilisation par liaison hydrogène intramoléculaire (Lucarini *et al.*, 2002).

➤ Chélation des ions métalliques

Les polyphénols contribuent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe²⁺) et le cuivre (Cu⁺), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant (Fe²⁺ pour la catalase et Cu⁺ pour la superoxyde dismutase). Cependant, ils peuvent aussi être responsables de

la production du radical OH[•] par la réduction de H₂O₂ lors de la réaction de Fenton (Pietta, 2000 ; Heim *et al.*, 2002).



En outre, l'autoxydation des ions Fe²⁺ et Cu⁺ est une source de O₂^{•-} et de H₂O₂. Ainsi, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action antioxydante. Les polyphénols abondants dans l'alimentation, notamment les flavonoïdes, séquestrent ces ions métalliques au niveau de différents sites.

➤ Inhibition des enzymes

Les polyphénols possèdent une affinité pour une grande variété de protéines (Dangles et Dufour, 2008; Havsteen, 2002), via des interactions de van der Waals (cycles aromatiques) et des liaisons hydrogènes (groupements OH phénoliques). Par exemple, les aglycones des flavonoïdes, essentiellement les flavones et les flavonols (noyaux tricycliques plans et polarisables), ont une capacité de se lier avec beaucoup de protéines globulaires, notamment des enzymes, des récepteurs et transporteurs (Dangles, 2012).

L'inhibition des enzymes génératrices des radicaux libres dans les systèmes biologiques est un mécanisme important d'effet antioxydant pour les polyphénols. Plusieurs travaux ont rapporté que les flavonoïdes sont les molécules les plus susceptibles d'être impliquées dans cet effet (Nagao, 1999 ; Lin, 2002), par formation de complexe inhibiteur-enzyme et/ou par piégeage direct des ERO (Dangles et Dufour, 2006). Cette double action est bien mise en évidence dans le cas de la xanthine oxydase, enzyme impliquée dans la maladie de la goutte, et qui catalyse une réaction du catabolisme des purines, en transformant l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique (Dangles et Dufour, 2008). Cette enzyme est considérée comme une source biologique importante de radical superoxyde. Les flavones et flavonols se lient à la XO en compétition avec le substrat xanthine, ce qui inhibe la formation de l'acide urique (IC₅₀ de 0,5 à 10 μM, à l'exception de la 3- hydroxyflavone qui n'interagit pas avec XO). D'autre part, le

flavanol (cycle C non plan) catéchine ne se lie pas à l'enzyme mais réduit efficacement le superoxyde ($IC_{50} = 0,48 \mu M$). Enfin, les flavones et flavonols ayant un cycle B de type catéchol comme la quercétine combinent les deux mécanismes, à savoir formation d'un complexe inhibiteur-enzyme ($IC_{50} = \mu M$) et réduction du superoxyde résiduel, qui s'est échappé de la cavité enzymatique ($IC_{50} = 0,33 \mu M$) (Day *et al.*,2000).

De nombreux flavonoïdes sont aussi de puissants inhibiteurs des métalloenzymes lipoxygénase, myéloperoxydase et NADPH oxydase (Dangles,2012).

Chapitre 3 : Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes

3.1. Généralités

La résistance bactérienne aux agents antimicrobiens est un problème d'importance croissante en pratique médicale. Si l'apparition des premiers antibiotiques (sulfamides en 1935 puis pénicilline au lendemain de la Seconde Guerre Mondiale) avait suscité un espoir de voir les maladies infectieuses à jamais jugulées, ce dernier fut déçu très rapidement par l'apparition de bactéries résistantes. L'utilisation ultérieure d'autres antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, tétracycline et érythromycine par ordre chronologique d'utilisation) connut une évolution comparable (Vaubourdolle, 2007).

Le phénomène de résistance bactérienne est connu pour toutes les familles d'antibiotiques. Il concerne toutes les espèces bactériennes qui pourront développer des mécanismes différents selon leur sensibilité initiale et leurs capacités à exprimer les diverses résistances d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes (Billing et Sherman, 1998 ; Vaubourdolle, 2007).

3.1.1. Phénotype de résistance (antibiotique)

La sensibilité ou la résistance à un antibiotique est généralement évaluée au laboratoire par la méthode de l'antibiogramme. Cette technique permet d'apprécier l'activité bactériostatique d'un ou de plusieurs antibiotiques vis-à-vis d'une bactérie. La lecture de l'antibiogramme d'un germe permet de déterminer l'expression phénotypique de la résistance de ce germe à un ensemble d'antibiotiques, et par là même de suspecter le ou les mécanismes de résistance (Vaubourdolle, 2007).

3.1.2. Support génétique de la résistance

On distingue deux types de résistance selon leur origine :

3.1.2.1. Résistance naturelle

La résistance intrinsèque (ou naturelle ou insensibilité) est présente chez toutes les bactéries de la même espèce ou du même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action des antibiotiques. Par exemple, la présence d'une membrane externe chez les bacilles à Gram négatif entraîne la résistance à diverses classes de molécules par imperméabilité (glycopeptides, macrolides, lincosamides, streptogramines, etc.) (Galimand *et al.* 2005).

3.1.2.2. Résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes. La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (Goossens *et al.*, 2006). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées (Yagupsky, 2006).

La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation. La dissémination des gènes de résistance aux

antibiotiques peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron vanA, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (Noble *et al.*, 1992 ; Alekshun et Levy, 2007).

3.1.3. Facteurs contribuant à la résistance

L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques sont le résultat d'une pression sélective exercée par les agents antimicrobiens et de la transmission de micro-organismes résistants (Simonsen *et al.*, 2004). La résistance étant un phénomène écologique résultant de la réponse des bactéries aux antibiotiques avec lesquels elles sont en contact, la simple utilisation des antibiotiques est le principal facteur influençant l'apparition de germes résistants. On peut parler d'utilisation excessive lorsqu'une trop grande quantité est utilisée dans le cadre de traitements ou pour la prophylaxie, que ce soit dans le domaine humain, agricole ou vétérinaire. D'autre part, on observe une utilisation inappropriée lorsque l'antibiotique est utilisé pour des infections virales, à des doses trop faibles ou trop élevées, sur une durée trop courte ou excessivement longue, favorisant ainsi l'apparition de souches résistantes (Von Gunten, 2004).

3.1.4. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne

La montée des résistances contre les principales classes d'antibiotiques, combinée au nombre limité d'agents en cours de développement, a conduit à l'avènement de l'ère post-antibiotique. Face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence de germes multi-résistants, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue. Les champs d'investigation sont vastes. Toutefois, deux grandes stratégies, recourant aux progrès de la modélisation moléculaire, de la biologie moléculaire, de la génomique et de la protéomique, se dessinent dans le domaine de la recherche (Guinoiseau, 2010).

La plus originale se base sur l'identification de nouvelles cibles bactériennes, en vue de développer des agents susceptibles d'inhiber les mécanismes de résistance ou d'interférer avec la virulence bactérienne (Schmidt, 2016). Au lieu de tuer les bactéries, ces nouvelles molécules atténueraient leur pouvoir pathogène en ciblant leurs gènes de résistance, leurs facteurs de virulence ou en entravant la communication intercellulaire. L'idée sous-jacente est d'empêcher les bactéries de s'adapter à leur environnement sans porter atteinte à leur survie, ce qui devrait ainsi limiter l'apparition des résistances. En réduisant la pathogénicité et la résistance bactérienne, ces molécules devraient permettre de restaurer l'activité des antibiotiques conventionnels devenus inefficaces.

Les efforts se concentrent également sur la recherche d'agents antibactériens, capables d'agir par de nouveaux mécanismes d'action (Schmidt, 2016). Ces molécules devraient être radicalement différentes des antibiotiques classiques, qui concentrent leurs effets sur une seule et même cible bactérienne. Aussi, pour être innovants, les nouveaux antibactériens devraient pouvoir induire la mort cellulaire en agissant simultanément sur plusieurs cibles bactériennes ou en développant des mécanismes d'action originaux. Depuis quelques années, les substances naturelles, qui avaient été délaissées au profit des molécules de synthèse, connaissent un regain d'intérêt.

Les ressources naturelles sont donc à nouveau exploitées pour mener à terme de telles recherches. Actuellement, l'accent est mis sur l'exploration de nouveaux réservoirs naturels, comme les peptides antimicrobiens, qui montrent déjà des résultats prometteurs. Les ressources plus anciennes, comme les bactériophages ou les plantes, suscitent également un regain d'intérêt.

3.2. Plantes médicinales et lutte contre la résistance aux antibiotiques

3.2.1. Plantes, source naturelle d'antimicrobiens

Les plantes synthétisent plus de 100 000 petites molécules dotées pour la plupart d'une activité antibiotique. En général, cette activité est inférieure à celle exercée par les antibiotiques d'origine microbienne (Tegos *et al.*, 2002 ; Lewis et Ausubel, 2006). Les concentrations requises pour exercer une activité antimicrobienne sont donc plus élevées pour les molécules isolées de plantes que pour celles issues de bactéries et de champignons. En effet, une molécule phytochimique est considérée comme « antimicrobienne » si elle inhibe la croissance des micro-organismes pour des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 100 µg/ml et 1000 µg/ml. Pour les antibiotiques d'origine microbienne, des CMI, variant de 0.01 µg/ml à 10 µg/ml, suffisent à générer une activité inhibitrice (Tegos *et al.*, 2002).

Le spectre d'action des antimicrobiens produits par les plantes est plus restreint que celui généré par les antibiotiques conventionnels. En effet, ces derniers possèdent une haute activité contre les bactéries à Gram positif, mais demeurent peu actifs contre les bactéries à Gram négatif et les levures (Lewis, 2001 ; Rüegg *et al.*, 2016). L'une des rares exceptions concerne l'acide 3-farnesyl-2-hydroxy benzoïque, isolé de la plante *Piper multiplinervium*. Ce composé montre une activité antibactérienne avec des CMI comprises entre 6.25 µg/ml et 37.5 µg/ml contre *Helicobacter pylori*, *E. coli* et *P. aeruginosa* (Gibbons, 2008). La xanthone, molécule géranylée, isolée de *Garcinia cambodgiae*, présente une haute activité anti-staphylococcique avec des CMI comprises entre 0.3 µg/ml et 1.25 µg/ml (Linuma *et al.*, 1998). L'hyperforine, produite par *Hypericum perforatum*, montre une activité encore plus élevée avec des CMI comprises entre 0.1 µg/ml et 1 µg/ml contre des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline et à la pénicilline (Schempp *et al.*, 1999).

2.2. Plantes, source naturelle d'inhibiteurs de l'efflux bactérien

Les plantes ont plusieurs stratégies pour contrôler les infections bactériennes. La synthèse d'un grand nombre de molécules faiblement actives, plutôt que de puissants antibiotiques, en fait partie. Cette stratégie semble d'ailleurs utilisée pour diminuer la pression sélective, qui favorise le développement des résistances. Toutefois, l'activité de ces antibactériens peut être potentialisée lorsqu'ils agissent en synergie avec d'autres molécules. La preuve a été fournie par les interactions établies entre deux composés produits par les plantes *Berberis* sp. : la berbérine et la 5'-méthoxyhydnocarpine (5'-MHC), (Guinoiseau, 2010).

La berbérine est un alcaloïde ayant pour cible cellulaire l'ADN. Ce cation hydrophobe est aussi un substrat des pompes d'efflux exprimées à la surface membranaire. Le rejet de la berbérine, hors de la cellule, limite son accumulation intracellulaire et, en l'empêchant d'accéder à sa cible, diminue son activité antibactérienne. Pour compenser cette faible activité, les plantes *Berberis* sp. synthétisent une flavonolignane, la 5'-MHC, qui, en bloquant les pompes bactériennes d'efflux, potentialise les effets de la berbérine. La combinaison « 5'-MHC/berbérine » agit donc comme un puissant antibactérien (Guinoiseau, 2010).

2.3. Plantes, productrices d'analogues des N-acylhomosérine-lactones

La production de substances, capables d'interférer avec la voie du quorum sensing (QS), semble être une autre stratégie employée par les plantes pour lutter contre les infections causées par les bactéries à Gram négatif. Des études ont démontré que les plantes *Pisumsativum* (Teplitski *et al.*, 2000 ; Bauer et Mathesius, 2004) et *Medicago truncatula* synthétisent des analogues des N-acylhomosérine-lactones (AHLs), molécules impliquées dans la régulation du QS de ces bactéries. Ces composés, mimétiques de l'action des AHLs, perturbent la communication intercellulaire bactérienne, en activant ou en inhibant certaines voies de la régulation du QS (Bauer et Mathesius, 2004). Même si ces composés n'ont pas encore été

identifiés et que les mécanismes par lesquels ils agissent restent à élucider, ils offrent des perspectives intéressantes pour la compréhension des relations hôte-bactérie et des comportements bactériens, notamment ceux impliqués dans l'expression de la virulence (Guinoiseau, 2010).

Chapitre 4 : *Matricaria pubescens*

La famille des Asteraceae (ou Compositae) est l'une des plus distribuées dans le règne végétal. Cette famille comprend plus de 13 tribus, 1000 genres et 23000 espèces (Guignard, 1994). En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces (Haghi *et al.*, 2014) et en France, 111 genres et 638 espèces (Gaussen et Leroy, 1999). Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires : Laitues (*Lactuca*), Endives, Chicorée (*Cichorium*), Artichauts (*Cynara*), Salsifis (*Tragopogon*). Le tournesol (*Heliantus annuus*) est cultivé pour son huile riche en acides gras. Plusieurs espèces sont utilisées en pharmacie : Le Semen-contra (*Artemisia cina* Berg), l'Arnica (*Arnica montana* L.), la Chamomille (*Matricaria chamomilla* L. et *Anthemis nobilis* L.), le pied de chat (*Antenaria diocagartn*), (Guignard, 1994). Une des propriétés typiques de la famille des Compositae est sa richesse en composés naturels divers. On y trouve des terpenoïdes, des flavonoïdes et des alcaloïdes. C'est une famille très riche en lactones sesquiterpéniques qui représentent des principes amers typiques de cette famille (Harborne et Swain, 2000).

1. Genre *Matricaria*

Selon Gaussen et Leroy (1999) les Compositae sont réparties en fonction de la forme de leurs fleurs en deux types : l'un ayant des fleurs à corolles ligulées et l'autre à corolles tubulées. Le genre *Matricaria* appartient à ce dernier type. Ce genre renferme des espèces à réceptacle conique. Elles se distinguent par l'absence de poils sur leurs parties végétatives et par le manque de paillettes sur le réceptacle de leurs capitules (Guignard, 1998).

2. Utilisations des matricaires

La matricaire est utilisée médicalement pour traiter l'estomac douloureux, le syndrome d'intestin irritable et comme une aide douce de sommeil. Elle est aussi utilisée comme un laxatif léger, anti-inflammatoire et bactéricide. Elle peut être prise comme une tisane, deux petites cuillères de fleur séchée par tasse de thé, qui devrait être faite tremper pendant dix à quinze minutes couverte pour éviter l'évaporation des huiles volatiles, certains recommandent de prendre une tasse chaque matin sans nourriture durant deux à trois mois (Mckay et Blumberg, 2006). Elle est aussi utilisée comme un bain de bouche. Elle a des propriétés acaricides contre certains tandinets, tels que *Psoroptes cuniculi* (Paris et Harschielle, 1981)

Les recherches sur des animaux indiquent que la matricaire possède des propriétés anti-inflammatoire, antimicrobienne, antioxydante modérées (Morteza, 2008), antispasmodique, anxiolytique, antimutagène et a une activité d'anti-plaquette significative en plus d'un effet baissant le cholestérol et un cicatrisant des plaies (Raju, 2007). La matricaire est utilisée dans les produits cosmétiques, essentiellement pour faire un rinçage pour les cheveux blonds et comme une émulsion d'écran solaire (Zhao, 2012). Les propriétés anticancéreuses ont été évaluées sur les extraits aqueux et méthanolique de *M. chamomilla* contre diverses lignées cellulaires cancéreuses humaines. Cette étude représente la première démonstration rapportée des effets anticancéreux de *M. chamomilla* (Srivastava et Gupta, 2007).

Une étude sur l'ésclétine (un composant majeur présent dans la plante *M. chamomilla*) a été établie en vu d'examiner son effet sur les enzymes clés du métabolisme des hydrates de carbone avec les rats diabétique sous l'effet de la streptozotocine (STZ). Les tests ont concerné : *glucose 6-phosphatase*, *fructose 1,6-bisphosphatase*, *glucokinase*, *glucose 6-phosphate dehydrogenase*. Les résultats de l'étude de l'ésclétine ont révélé un effet antihyperglycémique contre la streptozotocine provoquant le diabète chez les rats avec une concentration de 40 mg/kg (Prabakaran et Ashokkumar, 2012).

L'huile essentielle de *M. pubescens* a manifesté un effet analgésique meilleur que celui de l'acide acétyle salicylique avec des pourcentages d'inhibitions élevés à la dose 200 mg/kg (Boutaghane *et al.*, 2010).

3. Métabolites secondaires du genre *Matricaria*

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt interviennent dans les relations avec les stress biotiques, abiotiques ou améliorent l'efficacité de reproduction. Ils sont différents dans les différentes espèces telles que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpenoïdes et les alcaloïdes. Le genre *Matricaria* est caractérisé par une diversité structurale en métabolites secondaires riche en composés de types : coumarines, flavonoïdes, terpènes, hétérosides, sesquiterpènes lactonique (Guignard *et al.*, 1985)

3.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6 (Figure. 9) (Ghedira , 2005). Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Crozier, 2003) . Les flavonoïdes sont présents dans une grande variété d'aliments (fruits et légumes, céréales, jus de fruits, thé et vin...).

Les composés flavoniques sont des substances naturelles très répandues dans la famille des Compositae où beaucoup de travaux ont été réalisés chez le genre *Matricaria*. On trouve essentiellement des flavonoïdes glycosylés comme l'apigénine 7-glucoside et la lutéoline 7-glucoside (Figure. 10) (Bruneton, 1993)

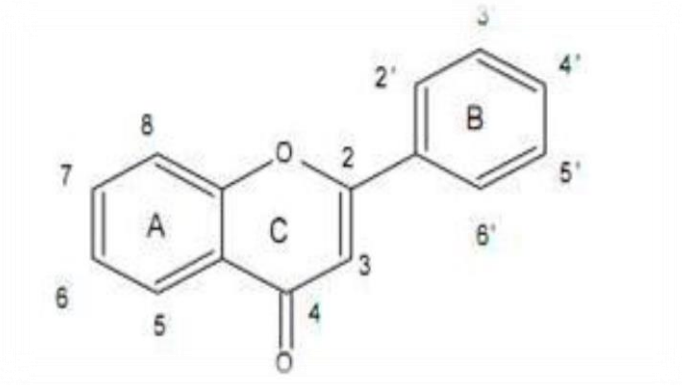
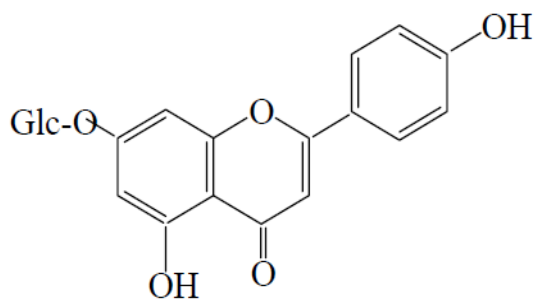
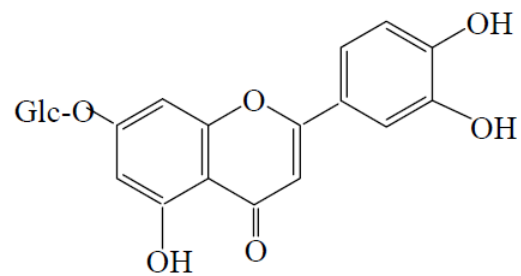


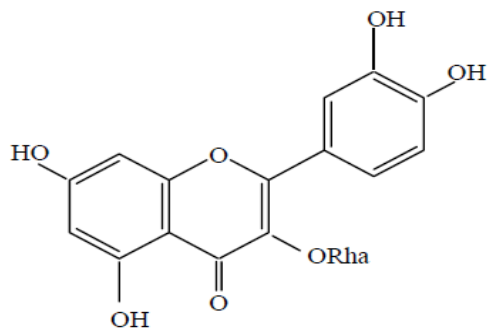
Figure 9: Squelette de base des flavonoïdes (Crozier, 2003).



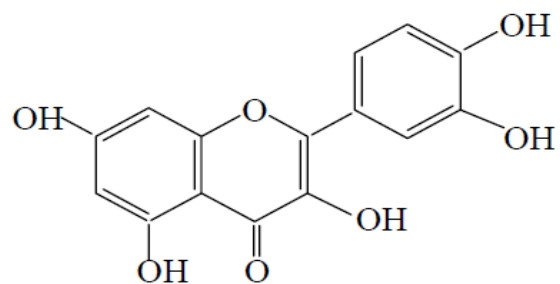
Apigénine 7-glucoside



Luteoline 7-glucoside



Rutine



Quercétine

Figure 10: Structures des flavonoïdes aglycone et glucosylés isolés du genre *Matricaria* (Bruneton, 1993)

L'étude chimique des espèces *M. recutita* et *M. chamomille* a permis également de mettre en évidence des flavonoïdes aglycones. L'analyse spectroscopique a permis d'assigner les structures de ces composés. Il s'agit de la rutine et de la quercétine (Figure. 10) (Kunde et Isaac, 1999).

Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits (Goto et Kondo, 1991) et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation (Van *et al.*, 2000). Les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-tumorales (Stavric et Matula, 1992), anti carcinogènes (Das *et al.*, 1994), anti-inflammatoires (Bidet *et al.*, 1987), antivirales (Amaral *et al.*, 1999), antiallergiques (Di Carlo *et al.*, 1999), anti hépatotoxiques (Wagner *et al.*, 2002).

3.2. Coumarines

La coumarine est une substance naturelle organique aromatique connue dans la nomenclature internationale comme 2H-1-benzopyrane-2-one qui peut être considérée en première approximation, comme une lactone de l'acide 2-hydroxy-2-cinnamique.

Le même terme de coumarine désigne aussi la classe des composés phénoliques dérivés de cette dernière molécule, la 2H-1-benzopyrane-2-one. Ces composés possèdent des hydroxyles phénoliques qui peuvent être méthylés ou être engagés dans des liaisons hétérosides. Plus d'un millier de coumarines naturelles ont été décrites. Elles sont très largement distribuées dans le règne végétal. Elles ont des propriétés phototoxique, antibiotique, spasmolytique, antifongique et anticancéreuse (Mirunalini et krishnaveni, 2011).

Les composés coumariniques rencontrés chez le genre *Matricaria* sont le plus souvent des composés simples comme c'est le cas de l'Herniarine et l'Umbelliférone (figure 11), (Tosi *et al.*, 1995 ; Repčák et Suvák, 2013)

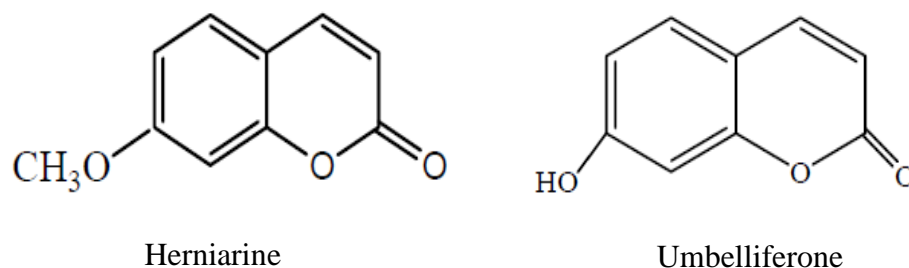


Figure 11 : Structure de l’Herniarine et l’Umbelliférone (Tosi *et al.*,1995) .

3.3. Sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont une classe de terpènes formée de 3 unités isopréniques et de formule moléculaire $C_{15}H_{24}$. Comme les monoterpènes, une molécule de sesquiterpène peut être acyclique ou contenir 1 à 2 cycles et de très nombreuses combinaisons sont possibles. Les sesquiterpènes sont présents dans les essences végétales aromatiques ou huiles essentielles. Dans les plantes, ils ont le rôle d'agent de défense. Les sesquiterpènes constituent un groupe de substances naturelles très importantes dans la famille des Astéracées ayant une large variété d'activités biologiques. Ils possèdent des propriétés : neurotoxique (Robles *et al.*,1995), anti-inflammatoire (Cho *et al.*, 2000), antileucémique (Kasai *et al.*,1992), antifongique (Skaltse *et al.*, 2000), anti-tumorale (Picman,1996). L'étude bibliographique du genre *Matricaria* a montré que ce dernier est très riche en sesquiterpènes et sesquiterpènes lactones, citons quelques exemples :

- ✓ L'étude phytochimiques des partie aériennes de *M. chamomilla* a permis d'isoler 3 sesquiterpènes lactoniques : matricolone, dihydroridentine, 2 α -hydroxyarborescine (figure 12) (Zaiter *et al.*, 2007).
- ✓ Chez *M. aurea*, des sesquiterpènes ont été extraits des parties aériennes : le bisabol (Das *et al.*, 2002), 1,2,3,6,7pentahydroxy-bisabol-10(11)-ene, 1,2,3,6,7-pentahydroxy-1- acetoxy-

bisabol-10(11)-ène, 1,2,3,6,7-pentahydroxy-2-acétoxy-bisabol-10(11)-ène et le 1,2,3,6,7-pentahydroxy-3-acétoxy-bisabol-10(11)-ène, (Ahmed et Abou Elela, 1999)

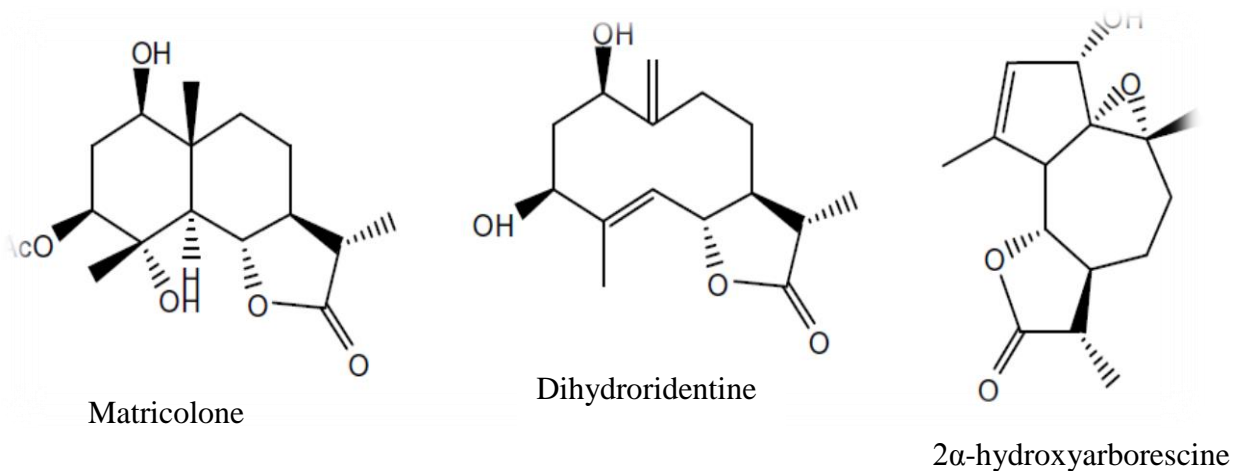


Figure 12: Structures des sesquiterpènes lactoniques isolés de l'espèce *M. chamomilla* (Zaiter *et al.*, 2007).

3.4. Amides

Un amide est un composé organique dérivé d'un acide carboxylique, possédant un atome d'azote lié à son groupement carbonyle (figure 13). Les amides sont un groupe important dans la cellule, parce qu'ils sont responsables de la liaison peptidique entre les différents acides aminés qui forment les protéines.

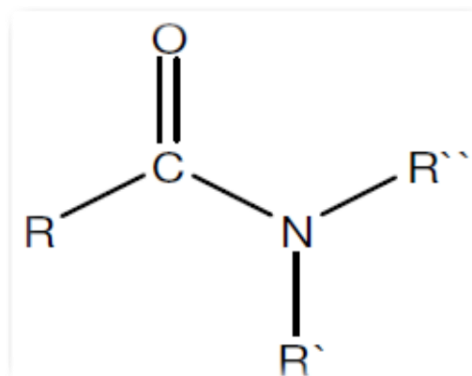


Figure 13 : Structure générale des amides.

Les parties aériennes et les racines de nombreuses espèces *Argyranthemum* (Doskotch et Beal, 1990) et l'espèce *Matricaria pubescens* (Greger, 1984) présentent un goût piquant et poivré dû à des métabolites secondaires comportant un radical isobutylamide. Ces amides peuvent être aromatiques (Fagaramide) ou aliphatiques (γ -Sanshool), (figure 14), (Giesbrecht *et al.*,1994).

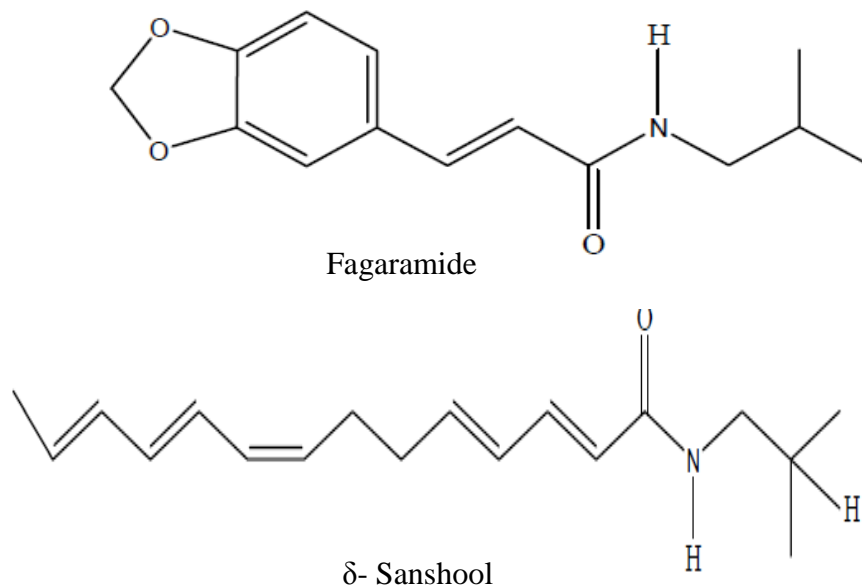


Figure 14 : Structures chimiques de quelques amides isolés du genre *Matricaria* (Giesbrecht *et al.*,1994).

Les isobutylamides oléfiniques possèdent des activités biologiques diverses, ils peuvent être anti-insecticides, anti-mollusques, anti-tussifs, stimulants, anti-inflammatoires, antiseptiques, analgésiques et anti-tumoraux (Bohlmann *et al.*,1995).

3.5. Les autres Constituants

Les substances suivantes ont également été isolées de plusieurs *Matricaria* :

- Chez *M. aurea*, la matricine et le bisabol ont été extraits des parties aériennes (Das *et al.*, 2002) .
- Des composés divers : des amides, polysaccharides, hydrocarbures, triglycérides et des acides gras (Stransky *et al.*, 1981) .

4. Espèce *Matricaria pubescens*

Matricaria pubescens est appelée localement ``Guertoufa``, elle se rencontre particulièrement dans tout le Sahara septentrional et Central. C'est une plante endémique très connue en Afrique du Nord (Quezel et Santa, 1983).

4.1. Nomenclature de plante

Matricaria pubescens (Desf.) Schultz : *Matricaria* vient du mot latin « matrice », utérus, correspondant à l'herbe *Matricaria*, une plante qui diminue les douleurs menstruelles ; *pubescens* : velu. Cette plante est appelée en arabe : Ouazouaza, Guertoufa, en Targui : Ainesnis, en Anglais : Hairy camomile et en Français : camomille pubescente (Benhouhou et Saadoun, 1986).

4.2. Classification

M. pubescens est classée selon le tableau 1.

Tableau. 1: Classification systématique de *M. pubescens* (Touafek, 2010).

Embranchement	Spermaphytes
Sous-Embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotyledones
Sous-classe	Compositae
Ordre	Asterales
Famille	Astéracées
Genre	<i>Matricaria</i>
Espèce	<i>pubescens</i>

4.3. Description morphologique

Matricaria pubescens est une petite plante annuelle, de 10 à 20 cm, à tiges nombreuses couchées puis redressées. Les tiges vertes sombres et minces sont juste légèrement ramifiées (Bounaga, 1999). Les feuilles profondément disséquées avec chaque extrémité du lobe en pointe blanche sont légèrement charnues et d'une longueur entre 10 et 20 mm. Les fleurs jaunes tubulaires sont groupées en têtes discoïdes hémisphériques (Figure 15). Les têtes des fleurs ont un diamètre de 5 à 8mm environ, et placées à la fin des tiges. Les fruits sont akènes avec une petite aigrette membraneuse qui aide à la dispersion. La plante entière a une odeur très agréable. La floraison se voit en printemps au nord de Sahara algérien (Bounaga, 1999 ; Ozenda, 2004).



Figure 15 : Photo de la plante *Matricaria pubescens* (Ozenda, 2004).

4.4. Distribution géographique

Matricaria pubescens est commune au Sahara algérien, c'est une plante endémique au nord d'Afrique (Benhouhou et Saadoun, 1986). Elle grandit dans les conditions du désert avec une moyenne annuellement de pluviométrie de 100 mm. Elle est toujours trouvée dans les Wadis non salés et les terrains du sable argileux protégé et occasionnellement dans les terrains sablés caillouteux (Bellakhdar, 1997).

4.5. Utilisations traditionnelles de la plante

Dans une large mesure, l'utilisation de cette plante dans la médecine traditionnelle est très variée. Selon le nombre de personnes provenant de différentes parties du désert, elle est utilisée pour traiter la dysménorrhée (tous les troubles des conditions liées à la menstruation), la toux, les maladies oculaires et rénales, les rhumatismes, les douleurs des maladies infectieuses et de l'abdomen, la sécheresse, la dentition, les allergies, des troubles gastro-intestinaux et la morsure des scorpions. Elle est également utilisée dans la saveur des soupes, en particulier au cours du mois de Ramadan ; le beurre fondu des chèvres lorsqu'il est filtré à travers les tiges et les feuilles

de la plante devient très parfumé et se conserve mieux. Elle peut être ajoutée au thé (Bellakhdar *et al.*,1991).

4.6. Domaines d'utilisation du *Matricaria pubescens*

4.6.1. Alimentation

Cette plante est utilisée pour donner une bonne saveur au thé. Dans la région sud-ouest algérienne elle est aussi utilisée pour la préparation des soupes et dans la conservation du beurre transformé traditionnellement (D'han), (Ould el Hadj *et al.*, 2003).

4.6.2. Médication

Matricaria pubescens (Desf.) est utilisée dans les affections oculaires, démangeaison, dysménorrhée, inflammations des plaies (Hammiche et Maiza, 2006), rhumatismes, toux, otites et affections oculaires, calculs biliaires et affection gastro-intestinales, (Bellakhdar, 1997 ; Ould el Hadj, 2003). Selon Hammiche (1993). L'usage traditionnel de cette plante varie d'une région à l'autre. A El-Goléa elle est utilisée pour traiter les rhumatismes, courbatures, déshydratation, dentition, dysménorrhée, affections oculaires, toux et les allergies (Subiza *et al.*,1991). A Béchar elle sert contre la toux, allergies et les affections oculaires (Ramos *et al.*,1996), alors qu'à Ouargla on la prescrit contre la toux, dysménorrhée, les piqûres de scorpion et les allergies. En usage externe, la matricaire est utilisée couramment dans le domaine dermatologique (Delille, 2007). Elle possède des propriétés anti-infectieuses : antifongique, antibactérien (Boutaghane *et al.*, 2010).

1. Matériel biologique

1.1. Matériel végétal

La plante *Matricaria pubescens* a été récoltée de la région d'Ouargla au mois d'avril 2013. L'identification a été faite par Pr. Zaafour (Département de Biologie Université de Annaba). La partie aérienne (PA) (tiges, feuilles et fleurs) a été nettoyée, séchée stockée à l'abri de la lumière ensuite broyée en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique.

1.2. Matériel animal

L'inflammation aiguë est réalisée sur des souris mâles de la souche Wistar pesant 30 ± 5 g, alors que l'inflammation chronique a été réalisée sur des rats male Wistar albino dont le poids varie entre 120 et 150 g, fournis par l'Institut Pasteur d'Alger. Ces animaux sont élevés au niveau de l'animalerie de l'université de Guelma. Les animaux répartis en groupes de 5, sont hébergés dans des cages en polypropylène à une température ambiante ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) avec accès libre à l'eau et à l'aliment. Après une période d'adaptation de 7 jours, les animaux sont pesés et marqués avant leur utilisation.

2. Méthodes

2.1. Criblage phytochimique

Des tests en tube sont réalisés sur la poudre de la partie aérienne de la plante afin de déterminer de manière préliminaire, les classes phytochimiques. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ainsi qu'à des examens en lumière ultraviolette. Ces techniques permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal.

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes... etc.

2.1.1. Test des alcaloïdes

Une pesée de 10g de la plante, mise en poudre, est mélangée à 50 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est ensuite filtré puis on y ajoute NH_3 jusqu'à pH: 8 à 9, on fait ensuite l'extraction par CHCl_3 (3 fois), on évapore le CHCl_3 , on ajoute à l'extrait sec 2 ml d'HCl (1%) puis on ajoute 3 gouttes de réactif de Mayer (KI 2.5%, HgCl_2 0.68%). L'apparition de précipité blanc ou une phase trouble indique la présence des alcaloïdes (Benzahi *et al.*, 2001)

2.1.2. Test des saponosides

Une pesée de 2 g de poudre de la plante est mélangée à 80 ml d'eau distillée puis porter à ébullition pendant 5 minutes. Après filtration, l'extrait est refroidi et agité vigoureusement pendant 2 minutes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de saponosides (Azzi, 2013).

2.1.3. Test des flavonoïdes

Dix grammes de la plante mise en poudre, sont mélangés à 100 ml d'HCl (1%). Ce mélange est macéré durant 24 h, après filtration NH_4OH (5%) est ajoutée au filtrat jusqu'à la basicité (pH : 12). L'apparition d'une couleur jaune claire indique la présence de flavonoïdes (Amakura *et al.*, 2013).

2.1.4. Test des coumarines

On évapore 10 ml de l'extrait Ether di éthylique, l'extrait sec est repris dans 2 ml d'eau distillée, est ensuite partagé dans deux tubes à essais (l'un servira de référence). Au contenu de

l'autre, 0.5 ml de NH_4OH (10 %) est ajouté. Après mélange, la fluorescence sous UV est observée. La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence (Koffi *et al.*, 2009).

2.1.5. Test des stérols et triterpènes

Cinq (5) grammes de la plante en poudre ont été mis dans 20 ml de chloroforme. Après filtration la solution obtenue est répartie en deux tubes à essais (l'un servira de référence). On ajoute d'abord 1 ml de l'anhydride acétique (Ac_2O); ensuite 1ml d' H_2SO_4 (2%) au fond du tube sans agiter. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence des stérols et des triterpènes. C'est la réaction de Liebermann-Buchard (Diallo, 2004; Saeed *et al.*, 2012)

2.1.6. Test des Tanins

Une pesée de 10g de la plante en poudre est extraite par l'alcool éthylique 50%, puis filtrée et ajoutée de quelques gouttes FeCl_3 (1%). En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre (Song *et al.*, 2010).

2.1.7. Test des glycosides

A 5g de la plante en poudre, sont ajoutés 50 ml d'une solution de l'acide tartrique 2% dans l'éthanol et soumis à chauffage à reflux durant 2 h. Après filtration et lavage par l'éthanol, le filtrat est mis dans l'eau chaude. Dans un tube à essai, 2 ml du filtrat sont ajoutés 2 gouttes de la liqueur de Fehling (0.5ml réactif A et 0.5 ml réactif B) et chauffés. La réduction de la liqueur de Fehling montre la présence des glycosides (Azzi, 2013).

2.2. Préparation des extraits bruts

Une pesée de 100 g de poudre végétale est mise en contact avec le solvant d'extraction choisi de manière à solubiliser le maximum de composés. Trois solvants ont été testés : le

méthanol, l'acétone avec une proportion de 70/30 (v/v). La poudre de la plante a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique pendant 48 h, en répétant cette opération 3 fois. Le macérât obtenu est filtré puis concentré à sec sous pression réduite et à une température d'environ 45°C (Arrar *et al.*, 2013) et l'eau chaude (infusion) pour se rapprocher des préparations traditionnelles, une posée de 300g de la poudre végétale a été placées avec 2 litres de l'eau distillé dans un cristalliseur. Le mélange a été laissé sur l'agitateur environ 2 heures jusqu'à ébullition. Après refroidissement le mélange est filtré sur coton puis sur papier filtre. Le filtrat est concentré au rotavapor (Benzidane *et al.*, 2013). Le ratio 1/10 est retenu dans la présente étude. Les extraits ont été filtrés et évaporés à sec sous pression réduite.

2.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques (CPT)

2.3.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (TPT)

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu suivant le protocole décrit par Boumerfeg *et al.* (2009). Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et demolybdène (Mo_8O_{23}). L'intensité de cette couleur est proportionnelle au contenu en polyphénols totaux dans le mélange.

Une prise de 100 μ l d'extrait est mise dans un tube en présence de 750 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (dilué 10 fois). Après agitation vigoureuse et repos du mélange pendant 5 mn à 22°C, 750 μ l d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 60 g/l sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 725 nm après 90 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en terme d'équivalents acide gallique utilisé pour construire la gamme étalon (mg Eq AG/g MS) (Figure16)

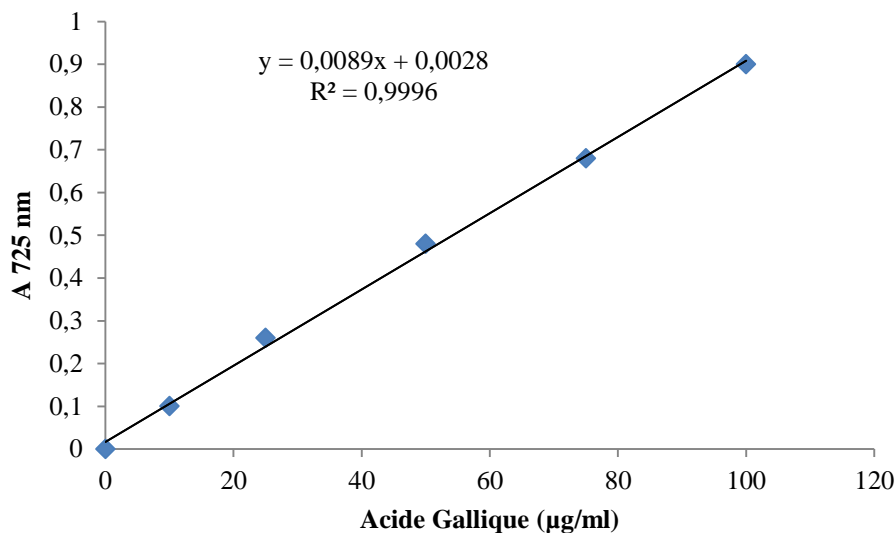


Figure 16 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

2.3.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium décrite par Baghiani et al. (2012). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et la soude, entraînant ainsi la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm. Une prise de 500 µl d'extrait est mise dans un tube en présence de 2 ml d'eau distillée additionnée de 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO_2 , 5%). Après 6 mn d'incubation à température ambiante, 150 µl d'une solution fraîchement préparée de chlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%) sont ajoutés au mélange. On apporte à ce dernier 2 ml d'une solution de soude (NaOH , 4%) après 6 mn de repos puis on ajuste le volume final à 5 ml avec de l'eau distillée. L'intensité de la couleur rose est mesurée à 510 nm après 15 min d'incubation. Une gamme étalon à base de catéchine est préparée dans les mêmes conditions (Figure17). La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est alors exprimée en mg d'équivalents catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg Eq C/g MS).

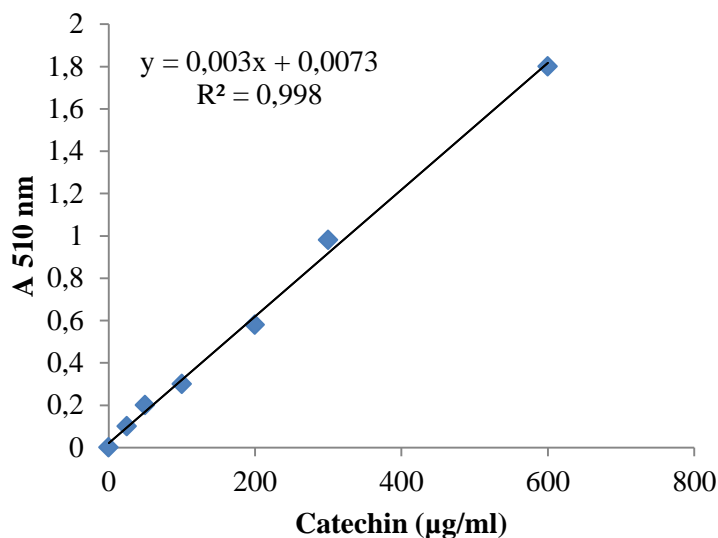


Figure 17: Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

2.4. Pouvoir antioxydant des extraits bruts

2.4.1. Piégeage du DPPH

Le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), fut l'un des premiers radicaux utilisés pour étudier la relation structure / activité antioxydante des composés phénoliques (Beddou, 2015). Depuis, certaines modifications ont été apportées et un paramètre important a été introduit. La détermination de la IC₅₀ définie comme étant la concentration en substrat entraînant une diminution de 50% de l'absorption. A cette concentration, 50% du DPPH[•] est sous forme réduite (Brand-Williams *et al.*, 1995). Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphényl-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, le diphényl-picrylhydrazine, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel (Sanchez-Moreno, 2002).

Pour la mesure de cette activité, nous avons utilisé la méthode décrite par Baghiani *et al.* (2012) ; Belhaddad *et al.*, (2017). Des aliquotes de 100 µl des extraits testés à différentes

concentrations (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 et 0.8) sont placées dans une plaque à 96 puits en présence d'une solution hydrométhanolique (80/20, v/v) contenant le radical DPPH^{*} (6×10^{-5} M). En parallèle, un contrôle négatif (sans extrait) est préparé. Après 60 min d'incubation dans l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 515 nm en utilisant un lecteur de microplaques (Bio-Tek EL×800). A des fins comparatives, trois antioxydants standards sont utilisés : acide ascorbique (Vitamine C), le BHT (Butyl-hydroxytoluène, E 321) et le BHA (Butyl-hydroxyanisole, E 320). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition donné par la formule :

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

Où I % : Pourcentage d'inhibition, A_C : Absorbance du contrôle négatif et A_E : Absorbance de l'échantillon testé.

L'étude de la variation de l'activité anti-radicalaire en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (IC₅₀), plus la valeur de l'IC₅₀ est faible plus l'extrait est puissant vis-à-vis des radicaux libres.

2.4.2. Test au β-carotène/acide linoléique

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir de groupements méthylène diallyliques de l'acide linoléique (Kaur et Kapoor, 2002). Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β-carotène hautement insaturé qui perd ses doubles liaisons entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique, et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β-carotène (Yanishlieva et Marinova, 1995 ; Yang *et al.*, 2008).

La méthode décrite par Zerargui *et al.* (2015) a été employée avec une légère modification. Une émulsion β -carotène/acide linoléique est préparée par solubilisation de 2 mg de β -carotène dans 20 ml de chloroforme. Ensuite 4 ml de cette solution sont mis dans un ballon avec 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme (40°C), 100 ml d'eau distillée sont ajoutés. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée. Des aliquotes de 10 μ l d'extrait à différentes concentrations (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 et 0.8) sont placées dans une plaque à 96 puits en présence de 150 μ l d'émulsion. Deux témoins (positif où l'échantillon est remplacé par l'antioxydant de synthèse et négatif sans antioxydant) ont été aussi préparés avec la même procédure. Les microplaques ont alors été mises en incubation à 50°C pendant 120 min et l'absorbance est mesurée (à $t = 0$ et $t = 120$ min) à 490 nm grâce à un lecteur de microplaques. Le pourcentage d'inhibition (I%) est obtenu comme suit :

$I \% = [(A_E - A_{C120}) / (A_{C0} - A_{C120})] \times 100$, où A_E : absorbance de l'extrait à $t = 120$ min, A_{C120} : absorbance du contrôle (témoin négatif) à $t = 120$ min, A_{C0} : absorbance du contrôle (témoin négatif) à $t = 0$ min. L'activité est également exprimée en IC_{50} comme décrit pour le test au DPPH'.

2.5. Pouvoir antibactérien des extraits

L'activité antibactérienne des extraits bruts a été évaluée vis-à-vis des six souches pathogènes (Tableau.2). Les souches bactériennes proviennent du Laboratoire de microbiologie au niveau de l'université de Salford Manchester.

Tableau 2: Description et pouvoir pathogène des souches testées

Groupes de germes	Espèces	Références	Habitat préférentiel	Infections hospitalières les plus fréquentées
Bacille Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	- Matières fécales -Aliments contaminés -Eaux usées	- Infections urinaires -Plaies -Septicémies
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	- Sol, eau, plantes -Voies respiratoires -Matières fécales -Réfrigérateurs -Appareils sanitaires	-Infections respiratoires - Infections pulmonaires et urinaires -Brûlures -Plaies -Septicémies
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	- Matières fécales -Voies aériennes supérieures -Aliments contaminés -Sol, poussières	- Infections pulmonaires et urinaires -Plaies -Septicémies -Intoxications alimentaires
Bacille Gram +	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 10876	-Eaux -Aliments, Lait (en poudre) -Peau, cheveux	-Septicémies chez les immunodéprimés
Cocci Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-Nasopharynx -Périnée -Poussières, air -Aliments contaminés	-Infections cutanées, plaies, brûlures, abcès -Ostéites, ostéomyélites -Endocardites -Septicémies -Infections pulmonaires -Intoxications alimentaires
	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341	-Peau ; voies respiratoires supérieures ; oropharynx -Sol ; poussières ; eaux ; air	- Infections nosocomiales chez les immunodéprimés

2.5.1. Méthode de diffusion sur disque

La méthode de diffusion sur gélose a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne. Des disques de papier Wattman N°1 stérile de 6 mm de diamètre ont été stérilisés. Ces disques sont ensuite imbibés de 20µl d'extrait à tester à la dose de 10 mg/ml. Par ailleurs, la gélose de Mueller-Hinton stérile est coulée dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre jusqu'à une épaisseur de 4 mm puis laissées refroidir. Une suspension bactérienne de 18 à 24h est préparée avec le bouillon nutritif. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à l'aide d'un coton-tige stérile en tournant la boîte d'environ 60°C. La dernière étape consiste à

déposer à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose ensemencée par la souche à tester des disques imbibés. L'incubation dure de 18 à 24h (Belhaddad *et al.*, 2017). Durant cette période, les substances diffusent dans la gélose à partir des disques par capillarité. Après incubation, le diamètre d'inhibition autour des disques est mesuré et les valeurs sont exprimées en mm.

2.6. Effet anti-inflammatoire *in vitro*

2.6.1. Inhibition de la dénaturation des protéines

La méthode consiste à préparer quatre solutions (0,5 ml) : La première est la solution d'essai composé de 0,45 ml de la solution aqueuse du sérum albumine bovine (BSA) 0,5% (w/v) et 0,05 ml des différents extraits de la plante avec des concentrations variées (250, 500, 1000, 1500 µg/ml), la deuxième est la solution témoin composée de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 0,5% (w/v) et 0,05 ml d'eau distillée, la troisième est solution contrôle produit composé de 0,45 ml d'eau distillée et 0,05 ml des différents extraits de la plante avec des concentrations variées, la quatrième est la solution standard composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 0,5% (w/v) et 0,05 ml de la solution standard diclofénac sodium avec des concentrations variées (250, 500, 1000, 1500 µg/ml). Les solutions ont été incubées à 37°C pendant 20 min, ensuite la température était augmentée jusqu'à 57°C pendant 3 min. Après refroidissement des tubes 2,5 ml de la solution phosphate buffer saline (pH 6,3) ont été ajoutés à toutes les solutions (Ghosh *et al.*, 2015).

L'absorbance a été lue par spectrophotomètre UV-visible à 255 nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines été calculé comme suit:

$$I\% = [100 - (A_{\text{solution d'essai}} - A_{\text{contrôle produit}} / A_{\text{solution contrôle}})] \times 100$$

2.5.2. Stabilisation de la membrane des globules rouges humains

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* a été effectuée selon la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains (Suresh *et al.*, 2014). Le sang a été recueilli auprès d'un volontaire humain sain n'ayant pas pris de Anti-inflammatoire non stéroïdien pendant 2 semaines avant l'expérience. Il a été mélangé avec un volume égal de la solution Alsevers (2 g dextrose, 0,8 g citrate de sodium, 0,05 g d'acide citrique et 0,42 g chlorure de sodium dissout dans l'eau distillée). Le volume final a été préparé jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée). Cette solution de sang a été centrifugée à 3000 tr / min pendant 10 min et les hématies ont été séparées et ont été lavées avec une solution d'isosaline (0,85% NaCl) et une suspension à 10% v/v a été préparée avec de l'isosaline (Munawar *et al.*, 2015). La méthode consiste à préparer trois solutions, la première est la solution d'essai composé de 1 ml tampon phosphate (pH : 7.4) a prélevé, 2 ml solution saline hypotonique (NaCl 0,36%), 0,5 ml de différent extraits bruts testés de concentrations variées (250, 500, 1000 et 1500 µg / ml) et 0,5 ml des globules rouges humains à 10% (v/v), la deuxième est la solution contrôle composé de 1 ml de tampon phosphate et 2 ml d'eau et 0,5 ml de globules rouges humains 10% (v/v) dans une solution saline isotonique, la troisième est la solution standard composée de 1 ml de tampon phosphate, 2 ml de solution salée hypotonique, 0,5 ml solution de diclofénac sodium avec des concentrations variées (250, 500, 1000 et 1500 µg / ml) et 0,5 ml des globules rouges humains.

Tous les échantillons et contrôles ont été incubés à 37°C pendant 30 min. puis centrifugés à 3000 tr / min pendant 20 min. Le liquide surnageant a été séparé et la teneur en hémoglobine a été évaluée à 560nm. Le pourcentage d'hémolyse a été estimé en supposant que l'hémolyse produite dans le contrôle était 100%. Le pourcentage de stabilisation ou de protection de la membrane des GRH a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition de l'hémolyse} = [100 - (A_{\text{solution d'essai}} / A_{\text{Contrôle}})] \times 100$$

2.6.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (Inflammation aigue) *in vivo*

Pour mettre en évidence l'activité anti-inflammatoire un modèle expérimental d'inflammation aigue de la patte de la souris induit par la carragénine a été sélectionné. Des souris ont été mises à jeun, 12 heures avant l'essai. Des œdèmes sont induits par l'injection sub-plantaire (intra articulaire) d'une solution de carragénine au niveau de la patte arrière droite des souris, une heure après l'administration des extraits par voie intra-péritonéale (i.p). L'inflammation causée sera diminuée en présence de l'extrait ayant une activité anti-inflammatoire (Ossipov *et al.*, 1995). Une heure avant l'injection de la carragénine, un effectif de 30 souris pesant 25 ± 5 g est divisé en 5 groupes, chaque groupe reçoit par voie intra-péritonéale (i.p) les solutions expérimentales comme suit :

- **Groupe témoin négatif** (n=6): reçoit une solution de NaCl (0,9%).
- **Groupe positif (contrôle)** (n=6) : reçoit par injection subplantaire 0,1 ml d'une suspension de carragénine à 1% dans du NaCl 0,9%
- **Groupe standard** (n=6): reçoit par injection subplantaire 0,1 ml d'une suspension de carragénine à 1% et traité par l'anti-inflammatoire diclofénac (50 mg/Kg)
- **Groupe arthritique traité** (n=6): reçoit par injection subplantaire 0,1 ml d'une suspension de carragénine à 1% et traité par l'extrait aqueux *Matricaria pubescens* à la dose de 150 mg/Kg
- **Groupe arthritique traité** (n=6): reçoit par injection subplantaire 0,1 ml d'une suspension de carragénine à 1% et traité par l'extrait aqueux *Matricaria pubescens* à 300 mg/Kg.

Une heure après l'administration des traitements, chaque animal reçoit par injection subplantaire dans la patte arrière droite, 0,1 ml d'une suspension de carragénine à 1% dans du NaCl 0,9%. Le volume d'œdème de la patte a été mesuré, à l'aide d'un micromètre digital avant et après induction de l'œdème à des intervalles d'une heure pendant quatre heures. L'évolution de l'œdème de la patte a été déterminée chaque heure jusqu'à 4 heures. Le pourcentage d'augmentation (% AUG) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris. Il est donné par la formule suivante (Ossipov *et al.*, 1995):

$$\% \text{ AUG} = (\text{Dn} - \text{D}_0) / \text{D}_0 \times 100$$

Dn : diamètre de la patte à la n^{ème} heure après l'injection de la carragénine, D₀ : diamètre de la patte avant l'injection de la carragénine.

Le pourcentage d'inhibition (INH %) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris traitées par rapport au lot témoin. Il est obtenu par la formule suivante (Ossipov *et al.*, 1995):

$$\text{INH \%} = 100 \times (\% \text{AUG témoin} - \% \text{AUG traité}) / \% \text{AUG témoin}$$

2.6.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire (Inflammation chronique) *in vivo*

Le modèle expérimental d'inflammation chronique de la patte du rat induite par le collagène type II a été sélectionné pour évaluer l'effet anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de la plante. Un total de 20 rats males repartis en 4 lots aussi homogènes que possible en fonction de leur masse et traités.

L'œdème des pattes est induit par le collagène type II (3mg/kg) et l'adjuvant complet de Freund (CFA) selon la méthode de Arrar *et al.* (2013). Trois groupes des rats sont utilisés dans ce test. Les rats des groupes traités reçoivent 100 et 200 mg/kg de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* par voie orale (gavage) une heure après l'induction de l'œdème et quotidiennement

pendant 45 jours. Alors que les rats du groupe témoin sain reçoivent l'eau physiologique (NaCl 0.9%).

L'œdème des pattes est induit par une injection sous cutanée de 300 µl de CII et CFA. Suivi par un rappel après 7 jours de la première induction. L'épaisseur des pattes est mesurée avant et après l'induction de l'inflammation par un pied à coulisse numérique chaque 5 jours jusqu'à 45 jours (Delaporte *et al*, 2004). La différence de l'épaisseur est calculée. Pour chaque lot traité, le pourcentage d'inhibition (% INH) de l'œdème des pattes traitées par rapport au lot témoin malade (arthritique) est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ INH} = (\% \text{ AUG}_{\text{témoin}} - \% \text{ AUG}_{\text{traité}}) / \% \text{ AUG}_{\text{témoin}}$$

Ce % INH exprime le pouvoir d'inhibition de l'œdème par une substance, donc l'activité anti-inflammatoire de cette substance. Le pourcentage d'augmentation de la patte (% AUG) est donné par la formule :

$$\% \text{ AUG} = (V_t - V_o) / V_o$$

V_o = Volume de la patte sans traitement, V_t = Volume de la patte après l'injection de CII et traitement

2.6.5. Taux des cellules immunitaire

Taux de globules blancs est calculé par la technique d'FNS (Formule Numération Sanguine). La FNS est l'analyse des composants du sang. Elle est demandée couramment comme un outil permettant le diagnostic ou l'orientation de celui-ci.

3. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués in vivo sont exprimés en Moyenne \pm SEM par un logiciel (Graph Pad. Prism. V 7.03). La différence entre le contrôle et les différentes doses est déterminée par le test one way ANOVA pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ($p < 0.05$).

Résultats et discussions

Le processus général de caractérisation de nouvelles molécules bioactives à partir de matrices complexes, telles que les plantes, fait intervenir différentes étapes, dont les trois principales sont l'extraction, le fractionnement et l'identification des composés d'intérêt, toutes guidées par des analyses phytochimiques et des tests biologiques.

1. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les différents extraits préparés à partir de la partie aérienne du *Matricaria pubescens*, en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation. Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de notre plante. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique ou un examen sous la lumière ultraviolette.

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques réalisés sur le matériel végétal broyé de la partie aérienne de *Matricaria pubescens*, montrent la présence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et triterpènes, des saponosides, des coumarines et des glycosides avec des intensités variables. La mise en évidence des flavonoïdes dans la plante est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge intense en contact avec la tournure de magnésium. Les tanins sont présents avec une intensité importante, leur présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleue verdâtre dans les feuilles et les fruits, il s'agit donc des tanins catéchiques. Le test positif des stérols et triterpènes a montré leur présence avec l'apparition d'un anneau rouge brun et une couche surnageante de couleur verte. L'apparition d'une fluorescence sous une lumière ultra-violette indique la présence des

coumarines mais avec une faible intensité. On remarque aussi la présence des saponosides et des glycosides avec une quantité faible. Enfin, le screening chimique a montré également l'absence des alcaloïdes.

La nature des principes chimiques mis en évidence par le criblage phytochimique laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes des plantes étudiées. Il s'agit essentiellement : (1) des **flavonoïdes** : souvent présentés comme anti-inflammatoires, anti-allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiants, diurétiques, antibactériens, antiviraux *in vitro* (Bruneton, 2009), (2) des **tanins** : les applications des drogues à tanins sont assez restreintes et découlent de leur affinité pour les molécules protéiques. Par voie externe, ils imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont aussi un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. Par voie interne, ils exercent un effet antidiarrhéique certain. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique, antibactérien et antifongique clairement démontré de ces molécules est intéressant (diarrhée infectieuses, dermatites), (Bruneton, 2009). (3) des **saponosides** qui sont habituellement hémolytiques. Cette propriété est attribuée à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire. Il est également assez fréquent que ces molécules aient une très forte activité spermicide, logiquement corrélée avec l'activité hémolytique. *In vivo*, bon nombre de saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique. Quasiment dépourvus d'activité antibactérienne, les saponosides sont parfois actifs, *in vitro*, sur des virus (Bruneton, 2009).

L'espèce *Matricaria pubescens* renferme, en plus de ces molécules, des glycosides, des coumarines et des stérols et triterpènes. Ces derniers sont en majorité retrouvés dans les feuilles. La recherche des alcaloïdes et des dérivés quinoniques s'est montrée négative. Ceci est en accord avec les travaux de Makhloufi (2013).

Lakhdar et ses collaborateurs 2012 ont rapporté la présence des huiles volatiles, d'acides gras, des dérivées anthracéniques et des émodols dans les feuilles et les fleurs de *Matricaria pubescens* (Mebarki *et al.*, 2013), alors qu'ils ont affirmé l'absence des anthocyanosides et des composés réducteurs.

2. Rendements des extractions

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondant dans les extraits (infusé, acétone et méthanol) ont donné des rendements divers. En effet, le rendement de l'infusé est le plus important suivi de l'extrait méthanolique puis de celui de l'acétone (Tableau. 3).

Tableau 3 : Rendement d'extraction et la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux des différents extraits testés.

Extraits bruts	Rendement d'extraction (%)	Teneurs en polyphénols totaux (mg EAG/g)	Teneurs en flavonoïdes totaux (mg ECa/g)
Infuse	16.1	123,43	57.25
Méthanol 70%	12.63	95,51	78.13
Acétone 70%	9.24	129,12	44.48

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des polyphénols, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant (Ruiz, 2005). En plus de ces aspects quantitatifs, quel que soit la méthode d'extraction appliquée, elle doit tenir compte de la qualité de l'extrait. Dans la présente étude, la méthode de macération sous agitation permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bioactivité de ses

constituants (Rahmani, 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 par les températures élevées.

On constate la tendance d'extraire plus de composés avec l'eau qu'avec les autres solvants. Cela peut s'expliquer par le simple fait que l'eau est un solvant fortement polaire connu pour extraire une large gamme de molécules dont une quantité importante de composés non phénoliques comme les glucides et les protéines (Bonnaillie *et al.*, 2012).

3. Teneur en polyphénols totaux

Les différents extraits bruts, obtenus par extraction solide-liquide, ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en polyphénols. Les résultats sont exprimés en terme d'équivalents acide gallique. Les résultats de dosage des polyphénols totaux (TPT) montrent que l'extrait acétone renferme plus de CPT suivi par l'infusé puis l'extrait méthanolique (Tableau. 3). La répartition inégale des polyphénols dans les différents extraits d'une même plante a été rapportée par plusieurs auteurs (N'Guessan *et al.*, 2011 ; Gherib *et al.*, 2014 ; Ksouri *et al.*, 2017).

Le solvant d'extraction emporte des substances non phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (Djeridane *et al.*, 2006). Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Ce test, basé sur une réaction d'oxydoréduction, peut être également considéré comme une méthode permettant d'évaluer l'activité antioxydante (Prior *et al.*, 2005). De ce fait, les extraits les plus riches en composés phénoliques peuvent être également considérés comme des antioxydants plus puissants.

4. Teneur en flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux (TFT) des extraits bruts a été déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium. Les résultats sont exprimés en termes d'équivalents catéchine (mg ECa/g du poids sec). Les résultats montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient considérablement entre les différents extraits. Enregistrent un maximum taux de flavonoïdes dans l'extrait méthanol et un minimum dans l'extrait acétone (Tableau. 3). Ces résultats sont en concordance avec les travaux de Makhloufi (2013).

5. Potentiel antioxydant des extraits bruts

5.1. Piégeage du radical DPPH'

Les pourcentages d'inhibition correspondant à différentes concentrations de chaque extrait (I%), sont présentés dans la figure 18. Les valeurs correspondantes des IC_{50} (la concentration de l'antioxydant nécessaire pour piéger 50% des radicaux libres) sont déterminées.

Les profils de l'activité anti-radicalaire révèlent que les extraits testés possèdent une activité dose-dépendante. L'extrait hydro-acétonique de *Matricaria pubescens* a montré un pouvoir réducteur le plus important par rapport aux autres extraits. A une concentration de 0.8 mg/ml, il atteint un pourcentage d'inhibition égale à 78.30%, alors que les extraits hydro-méthanolique et aqueux n'ont atteint que 65.18% et 37.14%, respectivement à la même concentration.

Les valeurs des IC_{50} , présentées dans la figure 19, permettent d'évaluer et de comparer l'efficacité des extraits. Il est admis que plus la valeur de la IC_{50} est faible plus l'extrait est puissant *vis-à-vis* des radicaux libres. On constate que les extraits les plus riches en composés phénoliques sont les extraits les plus actifs.

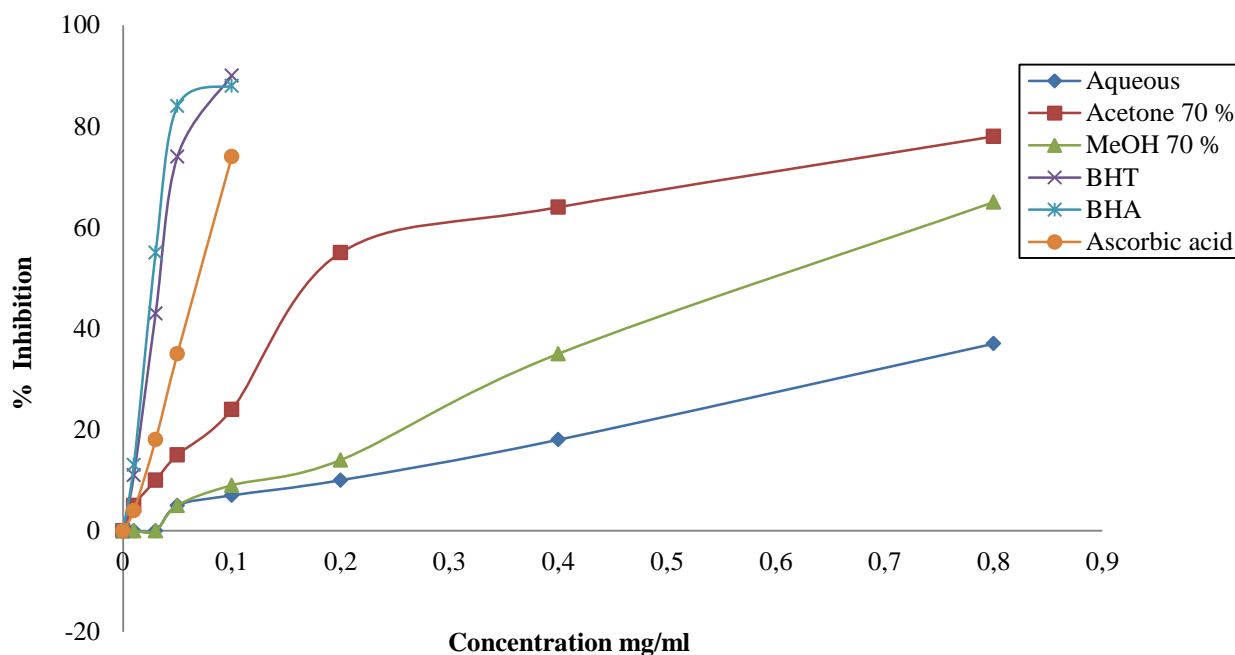


Figure 18 : Profils de l'activité anti-radicalaire (test DPPH[•]) des extraits bruts. MeOH 70% : extrait hydro-méthanolique ; Acétone 70% : extrait hydro-acétonique ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole butylé.

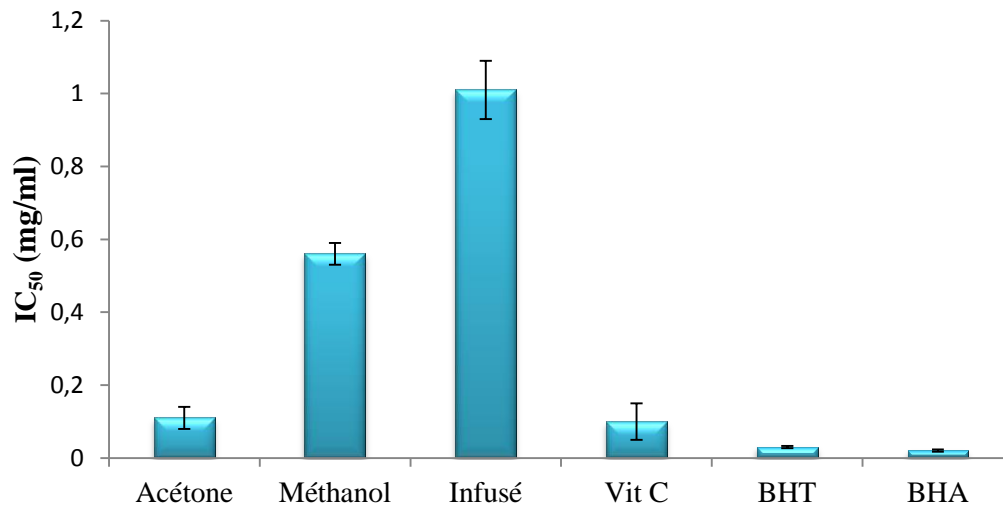


Figure 19 : Résultats des IC₅₀ (exprimées en mg/ml) d'inhibition du DPPH des différents extraits bruts. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures \pm SEM ; IC₅₀ = concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres ; Vit c : acide ascorbique ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole.

5.2. Inhibition du blanchiment de β -carotène

Les résultats du test de blanchiment de β -Carotène sont présentés dans la figure 20. Les valeurs des IC_{50} sont regroupées dans la figure 21. Il est évident que tous les extraits testés inhibent l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène. A une concentration de 0.8 mg/ml, l'extrait hydroacétonique révèle une puissante activité inhibitrice supérieure à celle de la vitamine C et qui dépasse les 76%. Les autres extraits présentent à cette même concentration un pourcentage nettement inférieur.

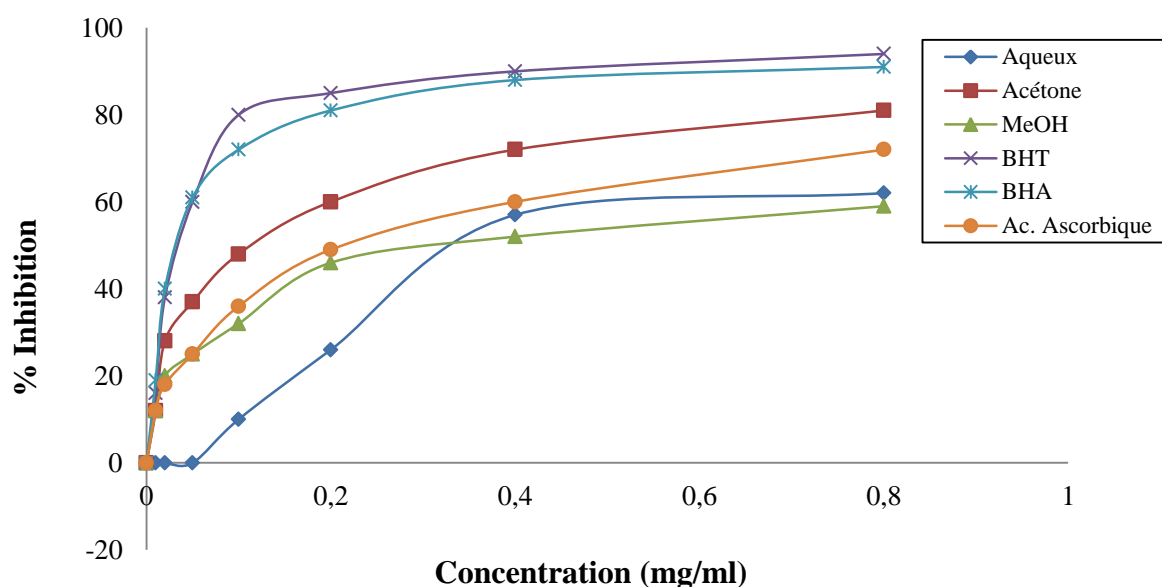


Figure 20 : Profils de l'activité inhibitrice (test de blanchiment de β -carotène) des extraits bruts.

BHT : hydroxytoluène butylé; BHA : Hydroxyanisole butylé.

L'analyse de l'ensemble des résultats obtenus pour cette activité affiche une nette hétérogénéité de son efficacité en fonction du solvant d'extraction. En effet, l'infusé montre des IC_{50} plus faibles en les comparant avec les deux autres extraits étudiés. Par ailleurs, l'extrait acétonique a démontré le pouvoir anti-radicalaire le plus élevé, une activité radicalaire qui est supérieure à celle de l'acide ascorbique.

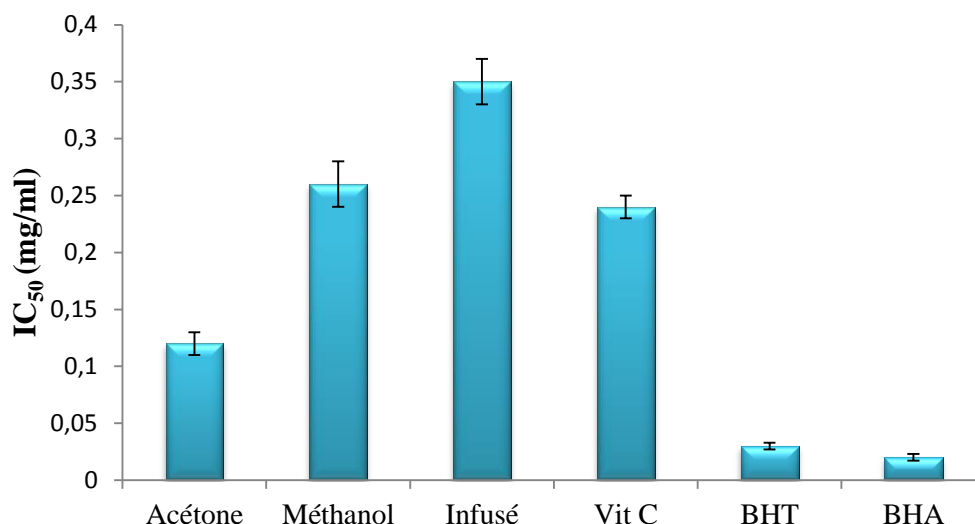


Figure 21 : Résultats des IC₅₀ (exprimées en mg/ml) d'inhibition de blanchissement du β -carotène des différents extraits bruts. Les valeurs représentent les moyennes de trois mesures \pm SEM ; IC₅₀ = concentration d'extrait nécessaire pour diminuer 50% du taux des radicaux libres ; Vit C : vitamine C ; BHT : hydroxytoluène butylé ; BHA : Hydroxyanisole.

Il existe des différences qualitatives dans la nature des composés phénoliques influençant le pouvoir antioxydant. Selon Liyana et Shahidi (2006), un extrait qui inhibe ou retarde le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire.

Les extraits des différentes parties de *Matricaria pubescens* exercent une activité antioxydante différente. Par conséquent, il est possible que l'activité antioxydante puisse être attribuée aux composés phénoliques présents dans *Matricaria pubescens* (Benammar *et al.*, 2010 ; Lamien-Meda *et al.*, 2008). Ces chercheurs ont en outre évalué la capacité antioxydante des extraits de *Matricaria chamomille* et ont finalement conclu que ce sont les polyphénols qui étaient responsables de leurs propriétés antioxydantes. Les résultats de l'étude de Rached *et al.* (2010), ils ont montré que l'extrait méthanolique des *Matricaria chamomille* possède une forte

activité antioxydante ($9,14 \pm 0,72 \mu\text{g/ml}$) comparée au BHA utilisé comme contrôle positif ($4,15 \pm 0,25 \mu\text{g/ml}$). En effet, Les polyphénols 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 des diverses pathologies associées au stress oxydant. Un très grand nombre de données expérimentales plaide aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'ostéoporose ou les maladies inflammatoires (Edmond., 2003).

6. Pouvoir antibactérien des extraits bruts

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels extraits des plantes. Lors de cette étude, l'action de trois extraits (aqueux, méthanolique et acétonique) de la plante *vis-à-vis* de quelques souches bactériennes est examinée. La méthode d'aromatogramme est la technique utilisée pour déterminer l'activité antimicrobienne des extraits. C'est la technique la plus répandue pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits bruts (Caillet et Lacroix, 2005). Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance des souches microbiennes testées sont rapportés dans la figure 22. On observe que les souches bactériennes réagissent différemment avec les différents extraits testés ; une zone supérieure à 12mm explique une sensibilité à l'extrait testé. Les extraits bruts de *M. pubescens* sont pourvus d'effet inhibiteur important sur toutes les souches testées. L'extrait acétone exerce une activité très importante comparé à l'extrait méthanolique et à l'infusé. Cet effet est représenté par une activité contre *Staphylococcus aureus* et *E. coli* avec des diamètres de 25 mm et 11mm, respectivement.

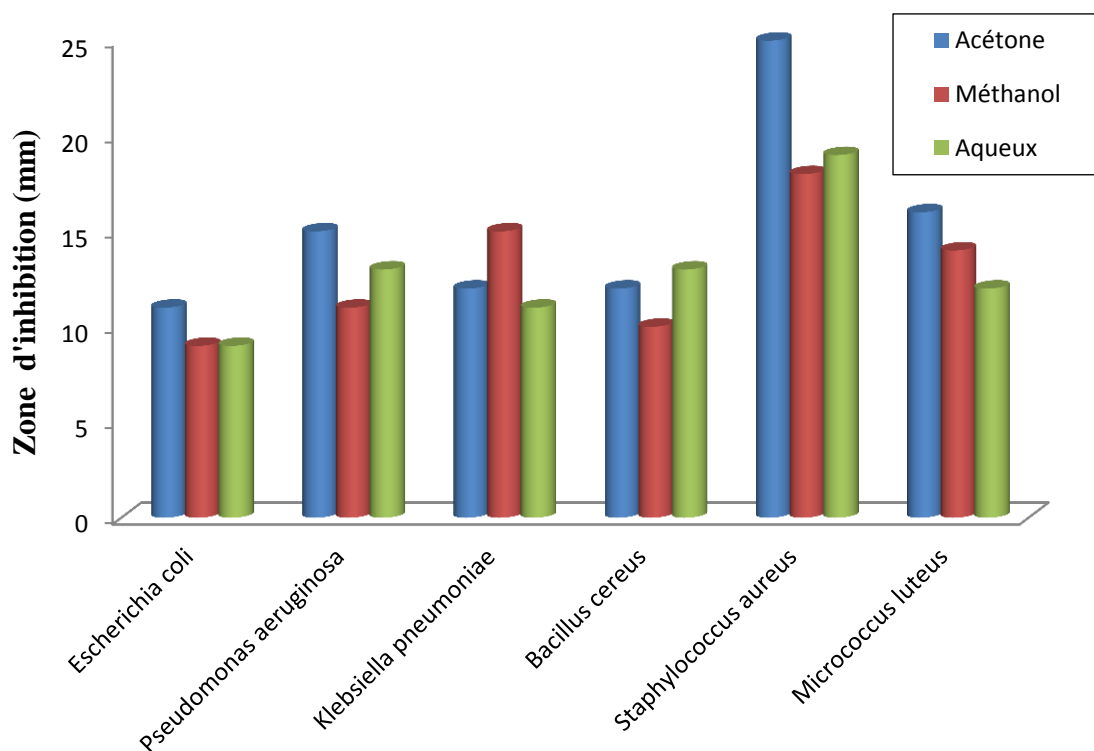


Figure 22 : Moyennes des diamètres des zones d’inhibition des différents extraits obtenues avec différentes souches suivant la méthode de diffusion sur gelose.

L’activité antimicrobienne des extraits des plantes médicinales a fait l’objet d’un grand nombre de publications à l’échelle internationale (Giordani *et al.*, 2006; Amarti *et al.*, 2015) dont plusieurs ont spécifiquement noté la forte activité sur les champignons filamenteux, les protozoaires et les mites en comparaison à celle exercée sur des bactéries et levures (Inouye et Abe, 2007). D’autre part, plusieurs travaux ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram⁺ par rapport aux Gram⁻ (Bencherif *et al.*, 2016). Néanmoins, certaines études n’ont révélé aucune activité antimicrobienne sélective *vis-à-vis* des bactéries.

Les résultats obtenus confirment une fois de plus l’efficacité des extraits des plantes médicinales et leur pouvoir antibactérien. De nombreux travaux soulignent cet effet antibactérien des principes actifs naturels. En effet, Mubashir *et al.* (2009) ont signalé que l’extrait aqueux des feuilles de l’espèce *Marrubium vulgare* exerce une forte activité inhibitrice sur les souches de

Staphylococcus aureus MTCC 740, *Staphylococcus epidermidis* MTCC 435 et une activité de degré moindre sur *Proteus vulgaris* MTCC 426 et *E. coli* MTCC 443. Alors, les composés phénoliques sont auraients pour cible les enveloppes des micro-organismes telles que la membrane cytoplasmique et la paroi, est lié à leur groupement hydroxyle libre qui permet une bonne solubilisation dans le milieu (Oussou *et al.*, 2010). D'autre part, Rhayour (2002) a montré que les extraits bruts ou leurs composés majoritaires phénoliques seuls ou associés avec les antibiotiques attaquent directement la bactérie en se fixant sur son enveloppe cellulaire, entraînant un déséquilibre de la perméabilité membranaire et un blocage de la phosphorylation oxydative qui représente la source de la vie respiratoire.

Nos résultats confirment l'efficacité des extraits du genre *Matricaria* et viennent appuyer les résultats publiés par Mekhloufi (2013). Cette variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre du contenu en polyphénols. De plus, Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différente manière selon les auteurs. Selon Bel-Rhlid *et al.* (2016), l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement OH sur leur cycle B sont plus actifs *vis-à-vis* des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle.

Au contraire, Mori *et al.* (1987) ont suggéré que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne. Les travaux de Sarker *et al.* (2005), ont également montré que l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre le nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs. Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols (Seidel, 2005). Cependant, la plupart de ces petites molécules

ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons.

Si l'on se réfère aux études de Moussaid *et al.* (2012), l'activité des principes actifs serait liée aux conditions de séchage et de broyage de la plante. D'autre part, Il semble que le broyage avec le nitrogène liquide soit recommandé, car le broyage est aussi à l'origine de la génération de la chaleur responsable de la perte des molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles (Jones et Kinghorn, 2015).

7. Activité Anti-inflammatoire *in vitro*

7. 1. Inhibition de la dénaturation du BSA

Le tableau4 montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits bruts de *Matricaria pubescens* qui consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de sérum albumine bovine (BSA).

D'après les résultats un rapprochement du taux d'inhibition de la dénaturation du BSA entre l'anti inflammatoire standard (Diclofénac) et les différents extraits étudiés de la plante avec les différentes doses testé ($P > 0.05$). Un maximal taux d'inhibition a été enregistré avec l'extrait aqueux à la concentration de 1500 $\mu\text{g/ml}$ suivi par le méthanol puis l'extrait acétonique.

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation (Bagad *et al.*, 2011 ; Falcão *et al.*, 2016). La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo*. Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (Mizushima et Kobayashi, 1998).

Tableau 4: Pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA des extraits bruts de *Matricaria pubescens*

Extrais bruts	Dose (µg/ml)	Pourcentage d'inhibition (%)
Infusé	250	8.50 ± 1.83 ^{ns}
	500	12.64 ± 1.09 ^{ns}
	1000	41.74 ± 1.76 [*]
	1500	63.08 ± 0.87 ^{**}
Méthanol	250	5.36 ± 2.05 ^{ns}
	500	9.85 ± 1.56 ^{ns}
	1000	32.45 ± 0.63 ^{ns}
	1500	54.23 ± 2.14 ^{**}
Acétone	250	2.54 ± 1.85 ^{ns}
	500	6.35 ± 0.76 ^{ns}
	1000	23.75 ± 1.55 ^{ns}
	1500	38.45 ± 2.30 ^{ns}
Diclofénac sodium	250	10.32 ± 0.70 ^{ns}
	500	16.15 ± 1.58 ^{ns}
	1000	45.57 ± 1.65 [*]
	1500	74.40 ± 2.21 ^{**}

Les valeurs représentent les moyennes ± standard erreur moyenne. ns : non significatif, p<0,05*significatif, p<0,01** très significatif, p<0,001*** hautement significatif, (n=3).

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le phenylbutazone et l'indométacine inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines (Sangeetha *et al.*, 2011). Ils empêchent la dénaturation de l'albumine traitée par la chaleur à pH physiologique (pH: 6.2 à 6.5). L'activité

inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes dans les extraits.

7. 2. Stabilisation des membranes des globules rouge humains

La méthode de la stabilisation des membranes des GRH a été choisie pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits bruts de *Matricaria pubescens in vitro* car la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomiale et sa stabilisation implique que l'extrait peut ainsi stabiliser les membranes lysosomiales. La Stabilisation de la membrane lysosomiale est importante dans la limitation de la réponse inflammatoire en empêchant la libération de constituants lysosomiques des neutrophiles activés tels que les protéases qui provoquent une inflammation des tissus et d'autres dommages lors de la libération extracellulaire (Shendkar *et al.*, 2014). L'hémolyse induite par l'hypotonie peut découler de la lyse des cellules en raison de la perte de pression osmotique du liquide intracellulaire et des composants électrolytiques. L'extrait peut inhiber les processus (Suresh *et al.*, 2014).

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits bruts de *Matricaria pubescens* qui repose sur l'inhibition d'hémolyse des globules rouges humains (GRH) est représentée dans le tableau 4. Une diminution significative ($P < 0.05$) dans le taux d'hémolyse des GRH avec les extraits bruts aqueux à la dose 500 µg/ml. Les résultats obtenus montrent que le pourcentage d'effet hémolytique en réduction lors de l'augmentation des concentrations des différents extraits de *Matricaria pubescens*. Concernant la diclofénac nous avons remarqué une diminution très significative ($P < 0.01$) de taux d'hémolyse des GRH à la comparaison avec le contrôle qui hémolysé 100%.

Tableau. 5: Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des GRH des extraits bruts de *Matricaria pubescens*.

Extrais bruts	Dose (µg/ml)	Pourcentage D'hémolyse (%)	Pourcentage d'inhibition d'hémolyse (%)
Infusé	250	69.63 ± 1.27 ^{ns}	30.37 ± 1.27 ^{ns}
	500	53.19 ± 1.49 [*]	46.80 ± 1.49 [*]
	1000	39.21 ± 0.91 ^{**}	62.45 ± 0.91 ^{**}
	1500	27.25 ± 1.24 ^{**}	72.74 ± 1.24 ^{**}
Méthanol	250	78.25 ± 0.88 ^{ns}	21.75 ± 0.88 ^{ns}
	500	64.65 ± 1.20 ^{ns}	35.35 ± 1.20 ^{ns}
	1000	48.06 ± 1.58 ^{**}	51.49 ± 1.58 ^{**}
	1500	39.57 ± 0.92 ^{**}	60.43 ± 0.92 ^{**}
Acétone	250	89.20 ± 1.56 ^{ns}	10.8 ± 1.56 ^{ns}
	500	76.36 ± 2.04 ^{ns}	23.64 ± 2.04 ^{ns}
	1000	66.85 ± 1.25 ^{ns}	33.15 ± 1.25 ^{ns}
	1500	58.42 ± 0.63 [*]	41.58 ± 0.63 [*]
Diclofénac	250	47.41 ± 1.08 ^{**}	52.59 ± 1.08 ^{**}
	500	35.19 ± 1.89 ^{**}	64.80 ± 1.89 ^{**}
	1000	15.55 ± 1.13 ^{***}	82.45 ± 1.13 ^{***}
	1500	09.92 ± 0.98 ^{***}	90.07 ± 0.98 ^{***}

Les valeurs représentent les moyennes ± standard erreur moyenne. ns : non significatif, p<0,05*significatif, p<0,01** très significatif, p<0,001*** hautement significatif, (n=3)

Cependant on a remarqué une diminution très significative (p<0.01) à la dose 1500 µg/ml de taux de l'hémolyse des GRH avec les extraits bruts et le Diclofenac. L'inhibition de l'hémolyse est considérée comme une activité anti-inflammatoire *in vitro*.

8. Activité Anti-inflammatoire *in vivo*

8. 1. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte

➤ Groupe contrôle

L'administration de la carragénine entraîne une augmentation très significative ($p < 0,01$) du pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des souris du groupe contrôle (35. 11%) en comparaison avec le groupe témoin sain à partir de la première heure de l'expérimentation. Cette augmentation et de plus en plus importante avec le temps. Elle est de 41,33 ; 56,44 et 46,66 % à la deuxième, troisième et quatrième heure, respectivement (Figure 23).

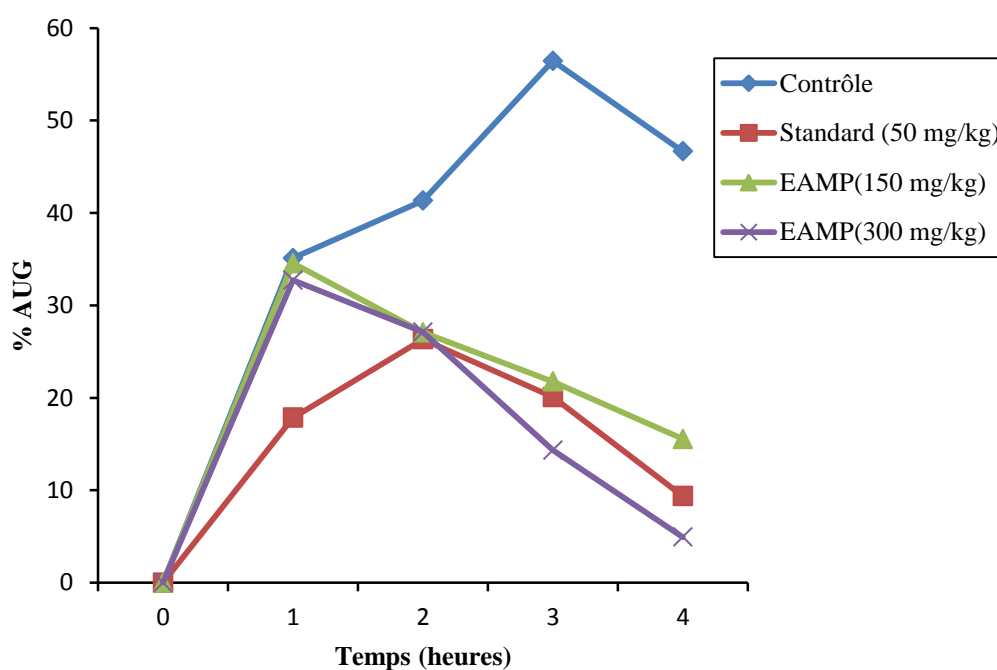


Figure 23: Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte des groupes testés.

➤ **Groupe standard**

Pour le groupe standard, les résultats obtenus montrent que l'administration de l'anti-inflammatoire de référence, le Diclofenac à 50 mg/kg provoque une diminution significative ($p < 0,05$) du volume de la patte des souris pendant la première et la deuxième heure estimée à 17,85 et de 26,33 %, respectivement. Cependant, une réduction hautement significative a été enregistré à partir de la troisième heure et continue jusqu'à la fin de l'expérimentation (Figure 23). Elle est estimée à 20,08 et 9,37 % à la troisième et quatrième heure, respectivement.

➤ **Groupes traités**

Dès la deuxième heure du traitement par l'extrait aqueux du *Matricaria pubescens* aux doses de 150 et 300 mg/kg de p. c, une diminution très significative ($p < 0,01$) est observée dans le volume des pattes des souris. Le pourcentage de réduction du volume est de 34,55 ; 27,11 ; 21,77 et 15,55% à la 1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} heure successivement, pour la dose 150 mg/kg et 32,73 ; 27,8 ; 14,34 et 4,93% pour la dose 300 mg/kg (Figure 23).

8.2. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH)

➤ **Groupes standards**

Pour le groupe standard, l'administration du Diclofenac à une dose de 50 mg/kg de p. c. cause une inhibition significative ($p < 0,05$) de l'œdème de la patte de souris à la première et deuxième heure. Une inhibition hautement significative ($p < 0,001$) est observée à troisième et quatrième heure. Cette activité atteint 79,91 % à la quatrième heure de l'expérimentation (Figure 24).

➤ Groupes traités par l'extrait aqueux *Matricaria pubescens*

L'administration intra-péritonéale de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* à la dose de 150 mg/kg présente une activité inhibitrice de l'œdème de la patte des souris, cette activité augmente progressivement jusqu'à la quatrième heure de l'expérimentation (Figure 24). De plus, aucune différence significative ($p > 0,05$) n'est notée entre les valeurs du pourcentage d'inhibition de l'augmentation du volume des pattes pendant la première et la deuxième heure respectivement.

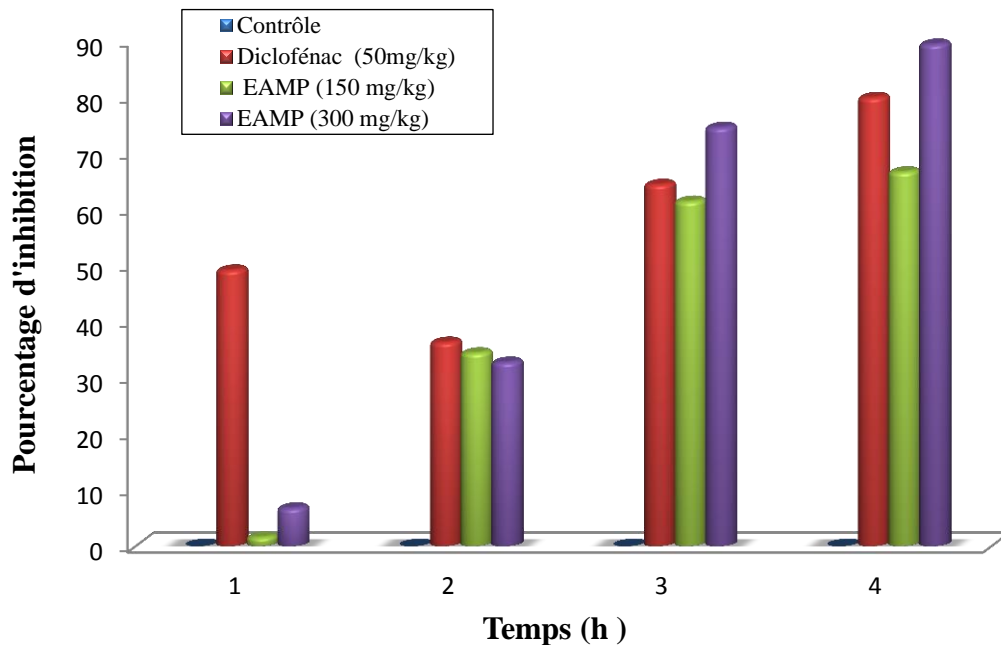


Figure 24 : Pourcentages d'inhibition de l'œdème des pattes des souris. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n=6).

A la dose de 300 mg/kg l'effet inhibiteur de l'extrait de *Matricaria pubescens* se manifeste dès la première heure qui suit l'injection de la carragénine avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 6,77 %, cette activité augmente progressivement jusqu'à la quatrième heure (89,43 %; $p < 0,001$), (Figure 24).

8.3. Taux des cellules immunitaire (leucocyte, lymphocyte et granulocyte)

Selon les résultats de la FNS une augmentation très significative ($p < 0.01$) de nombre des leucocytes chez le groupe contrôle ($12,5 \pm 0.51 \times 10^9 \text{ cell/L}$) par rapport aux témoins sains ($4.86 \pm 0.23 \times 10^9 \text{ cell/L}$) (figure 25). Cette augmentation est due à une forte inflammation dans le corps. D'après la figure 26 une diminution très significative ($p < 0.01$) de nombre des leucocytes chez les souris traité par le diclofénac (50mg/kg) et l'extrait aqueux (300 mg/kg) est de 6.2 ± 0.05 et $5.8 \pm 0.23 \times 10^9 \text{ cell/L}$ respectivement. Tandis que la dose 150 mg/kg diminuent significativement ($p < 0.05$) le taux des leucocytes ($8.1 \pm 0.62 \times 10^9 \text{ cell/L}$) à la comparaison avec le groupe contrôle.

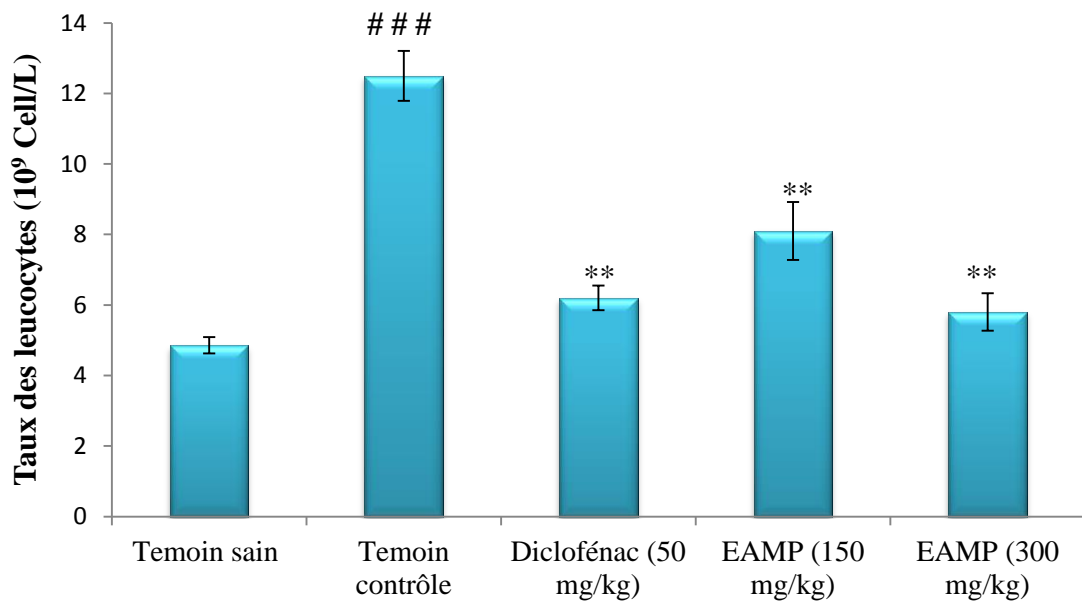


Figure 25: Taux des leucocytes chez les différents groupes traités. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. EAMP ; Extrait aqueux de *Matricaria pubescens*. ### $p < 0,001$ comparé au témoin négatif ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparé au témoin positif (contrôle), (n=6).

Concernent le taux des lymphocytes, une augmentation significative ($p < 0,05$) a été remarqué dans le groupe contrôle ($4.53 \pm 0.54 \times 10^9 \text{ cell/L}$) la comparaison avec le groupe témoin ($2.86 \pm 0.16 \times 10^9 \text{ cell/L}$) (figure 26). Cependant une diminution non significative ($p > 0,05$) est enregistrée avec les deux groupes traités par l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* à la dose 150 et 300 mg/kg qui estimé par $3.1 \pm 0.55 \times 10^9$ et $2.8 \pm 0.22 \times 10^9 \text{ cell/L}$ respectivement. Par contre une diminution significative ($p < 0,05$) est enregistrée avec le groupe traité par la diclofénac à la dose 50 mg/kg est de $2.2 \pm 0.30 \times 10^9 \text{ cell/L}$.

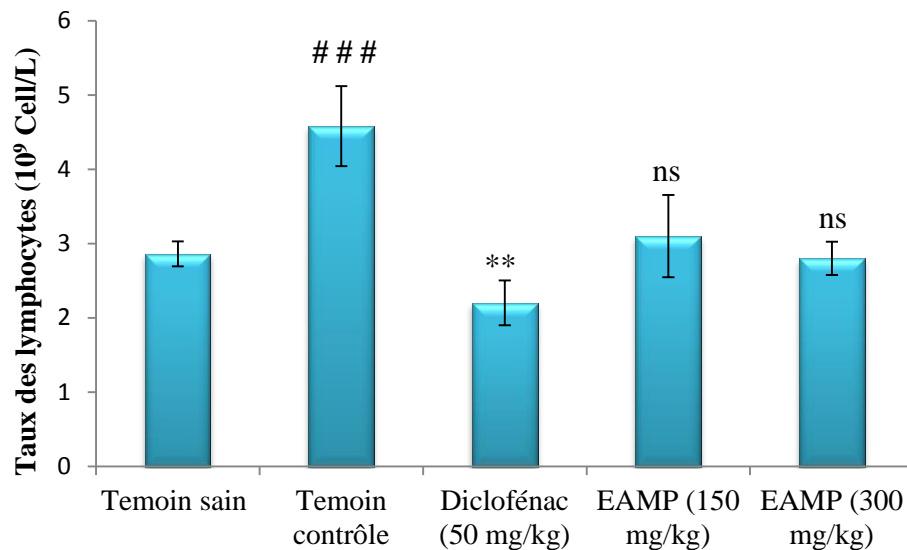


Figure 26: Taux des lymphocytes chez les différents groupes traités. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. EAMP ; Extrait aqueux de *Matricaria pubescens* .ns : non significatif, ### $p < 0,001$ comparé au témoin négatif ; ** $p < 0,01$ comparé au témoin positif (contrôle), (n=6).

La figure 27 représenté le taux des granulocytes des différents groupes testés. Une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) a été remarqué dans le groupe contrôle ($4.83 \pm 0.71 \times 10^9 \text{ cell/L}$) la comparaison avec le groupe témoin ($0.67 \pm 0.04 \times 10^9 \text{ cell/L}$). Cependant une diminution très significative ($p < 0,01$) est enregistrée avec les deux groupes traités par

l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* à la dose 150 et par le diclofinac (50mg/kg) qui est estimé par 2.13 ± 0.29 et $1.73 \pm 0.31 \times 10^9$ cell/L respectivement. Cependant une diminution hautement significative ($p < 0,001$) est enregistrée avec le groupe traité par l'extrait aqueux à la dose 300 mg/kg est de $0.93 \pm 0.09 \times 10^9$ cell/L.

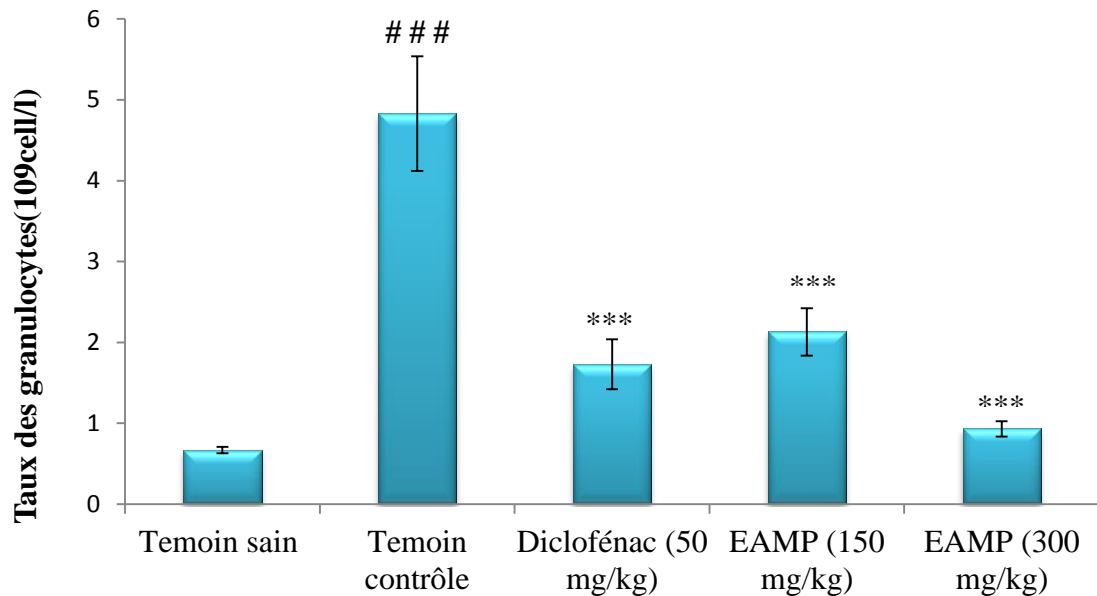


Figure 27: Taux des granulocytes chez les différents groupes traités. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n=6). EAMP ; Extrait aqueux de *Matricaria pubescens*. ### $p < 0,001$ comparé au témoin négatif ; *** $p < 0,001$ comparé au témoin positif (contrôle) (n=6).

L'inflammation aiguë induite chez la souris par l'injection de la carragénine est un modèle standard et pratique, largement utilisé pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de différents agents (Cuzzocrea *et al.* , 1998 ; Jilroy *et al.* , 1999).

Le mécanisme cellulaire et moléculaire par lequel la carragénine induit le processus inflammatoire est connu. Elle stimule la libération de l'histamine et de la sérotonine par les

mastocytes, initiant par cela une cascade d'évènements qui produisent d'autres médiateurs qui contribuent à l'installation de la réaction inflammatoire aiguë (Cuzzocrea *et al.*, 1998). En effet, la carragénine induit au cours de la phase précoce (1-2h) la production de facteurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine, les leucotriènes, le PAF et les prostanoïdes. Ces facteurs provoquent des modifications vasculaires qui conduisent à l'exsudation plasmatique. Durant la phase tardive de ce processus inflammatoire (4-12h), des facteurs chimioattractants induisent la migration des neutrophiles dans le site inflammatoire, où ils libèrent d'autres médiateurs inflammatoires et cytotoxiques (Dawson *et al.*, 1991 ; Cuzzocrea *et al.*, 2000a,b). Deux populations de cellules inflammatoires interviennent au cours de l'inflammation induite par la carragénine ; les neutrophiles prédominent durant les 12 premières heures. Ils sont ensuite remplacés par les monocytes qui se différencient en macrophages tissulaires. Ces mononucléaires dominent alors la réaction inflammatoire jusqu'à sa résolution après 48 heures (Jilroy *et al.*, 1999).

En plus de l'inhibition de la production des médiateurs pro-inflammatoires, les métabolites secondaires de *Matricaria pubescens* semblent inhiber le recrutement des neutrophiles vers le site de l'inflammation probablement par l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésions sur la paroi des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Anné *et al.*, 1994). En effet, les anthocyanines bloquent la migration des leucocytes au site inflammatoire par l'inhibition des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, ceci par la régulation du TNF- α . Tsuda et ses collaborateurs (2002) ont rapporté que l'administration du cyanidine 3-O- β -glucoside inhibe l'inflammation induite par le zymosan. Aussi, le traitement par la cyanidine 3-O- β -glucoside réduit l'augmentation des concentrations des NO, TNF- α , IL-1 β , et CINC-1 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1). De plus, la cyanidine 3-O- β -glucoside normalise les niveaux de plusieurs protéines de la phase aiguë, incluant l' α 2-macroglobuline, l'albumine, et la transferrine (Calixto *et al.*, 2004).

Les flavonoïdes inhibent la migration des leucocytes en bloquant leur adhésion à la paroi vasculaire (Manthey, 2000 ; Middleton *et al.*, 2000). Cet effet serait dû à l'inhibition de la synthèse de l'IL-1 et le TNF- α , principaux inducteurs de l'expression des molécules adhésives sur la paroi vasculaire (Cho *et al.*, 2000). Il a été rapporté en effet, que la Quercétine bloque l'adhésion des leucocytes à la paroi endothéliale des veines ombilicales par l'inhibition de l'expression des ICAM-1 (Anné *et al.*, 1994). Egalement, l'acide gallique à son tour inhibe la migration des leucocytes en inhibant les molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1, et E-selectin dans les cellules endothéliales vasculaires, cette inhibition est due à l'inhibition de la production l'IL-1, TNF- α , et le NF- κ B (Takatoshi *et al.*, 1999).

Prenant ces données ensemble, l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* exercera ses effets anti-inflammatoires par la réduction de la production des médiateurs inflammatoires impliqués dans le déroulement des étapes de la réaction inflammatoire aiguë induite par la carragénine, et/ou que par l'inhibition du recrutement des leucocytes vers le site d'inflammation en exerçant des effets anti-chimioattractants.

8.4. Effet de l'extrait aqueux sur l'arthrite induite par le collagène

8.4.1. Induction de l'arthrite rhumatoïde chez le rat

Pour une étude de l'effet anti-inflammatoire chronique, l'arthrite induite par le collagène type II chez les rats *Wistar albino* a été choisie. L'œdème des pattes a été induit par une seule immunisation sous cutanée de 300 μ l de C II en émulsion avec le CFA, suivi par un rappel après 7 jours par du CII dans le IFA. Le gonflement des pattes postérieures, apparu après 15 jours de la première injection du CII atteint son maximum le 25^{ème} jour (Figure 28). Les symptômes de la maladie n'ont touché que 3 rats parmi 5 (60%). L'inflammation est apparue au niveau des articulations des pieds, les articulations inter phalangiennes du pied et un faible pourcentage pour les articulations extérieures.

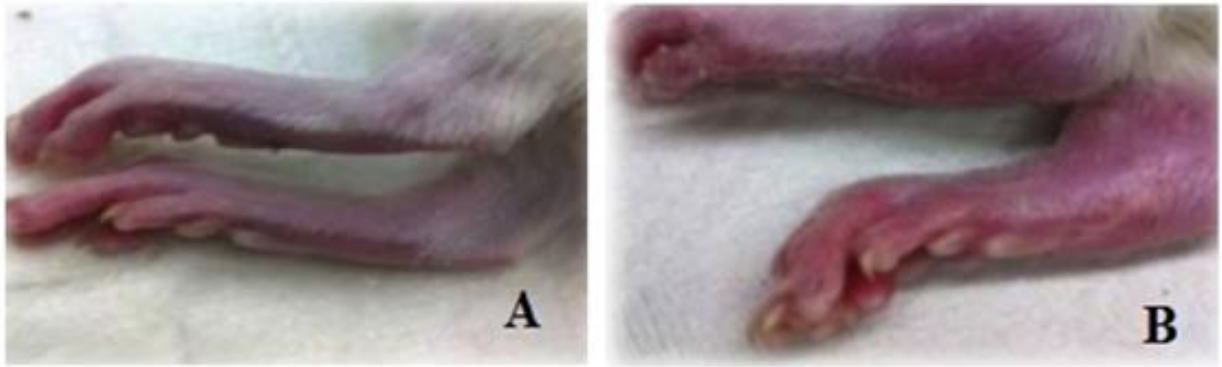


Figure 28: Photographies des pattes des rats : (A) témoin sain, (B) témoin arthritique.

8.4.2. Effet anti-œdémateux de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens*

Les rats témoins arthritiques ont développé un œdème caractérisé par une augmentation très significative ($p < 0,01$) en comparaison avec les pattes du groupe témoin sain. Le gonflement des pattes chez les rats témoins arthritiques était de $3,45 \pm 0,8$ mm au 15^{ème} jour et atteint son maximum au 25^{ème} jour ($6,71 \pm 0,25$ mm). Le gonflement est devenu très significatif ($p < 0,01$) dans le 45^{ème} jour avec une valeur de $5,96 \pm 0,24$ mm (figure 29).

Après 30 jours du traitement par l'extrait aqueux du *Matricaria pubescens*, une diminution significative ($p < 0,05$) du volume de l'œdème des pattes des rats traitées par la dose 200 mg/kg en comparaison avec le groupe contrôle positif, qui est estimé par $5,56 \pm 0,44$ mm; et $4,3 \pm 0,18$ mm dans le 30^{ème} et le 45^{ème} jour respectivement. Une diminution non significative ($p > 0,05$) du volume d'œdème des pattes des rats traitées par la dose 100 mg/kg en comparaison avec le groupe contrôle arthritique dans tous les jours du traitement (Figure 29 et 30).

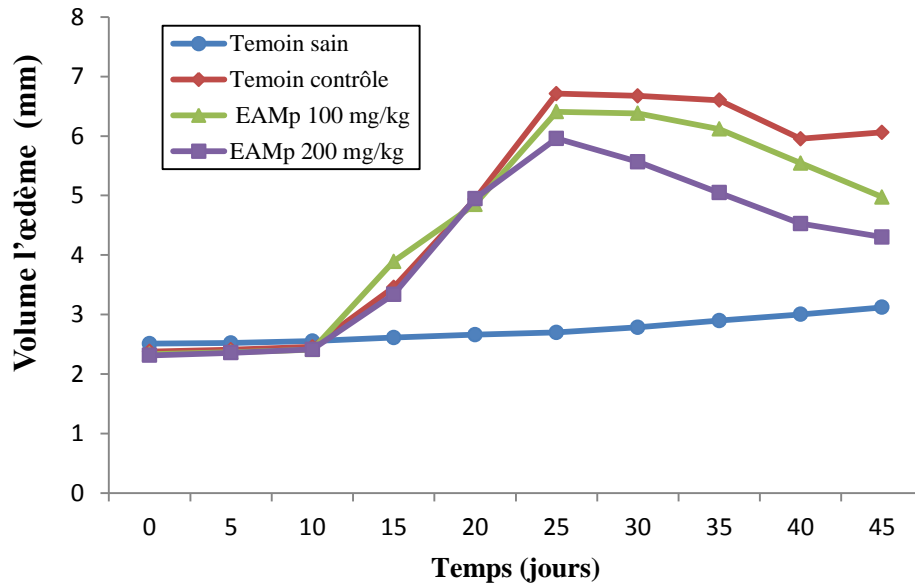


Figure 29 : Effet de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* sur l'œdème des pattes induites par le CIA chez le rat. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 5).

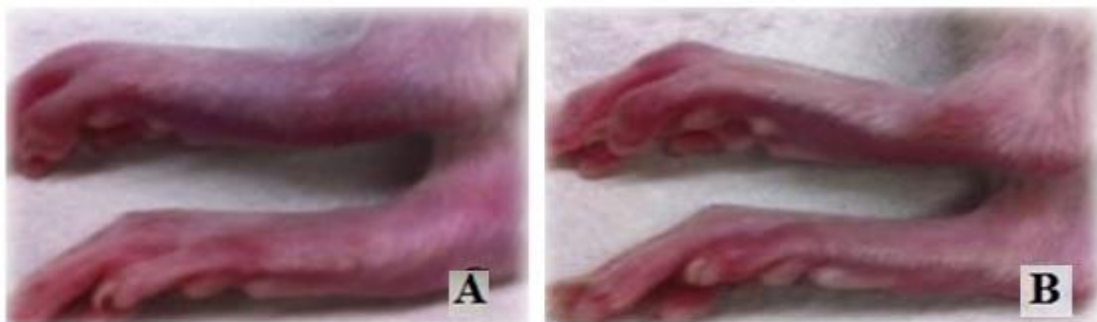


Figure 30: Photographies des pattes des rats traités: CIA + extrait aqueux de *M. pubescens* (A) :100 mg/kg, (B) :200 mg/kg.

8.4.3. Effet sur le poids corporel des rats

Les résultats mentionnés dans la figure 31, révèlent une augmentation significative du poids des rats de groupe témoins sains pendant la période d'expérience. Le poids du groupe témoin arthritique a été augmenté en parallèle à celui des témoins sains avec une différence de poids jusqu'à le 10^{ème} jour. Après le 15^{ème} jour un ralentissement de la croissance est observé accompagnant le gonflement des pattes qui rend l'axe des rats à la nourriture plus difficile.

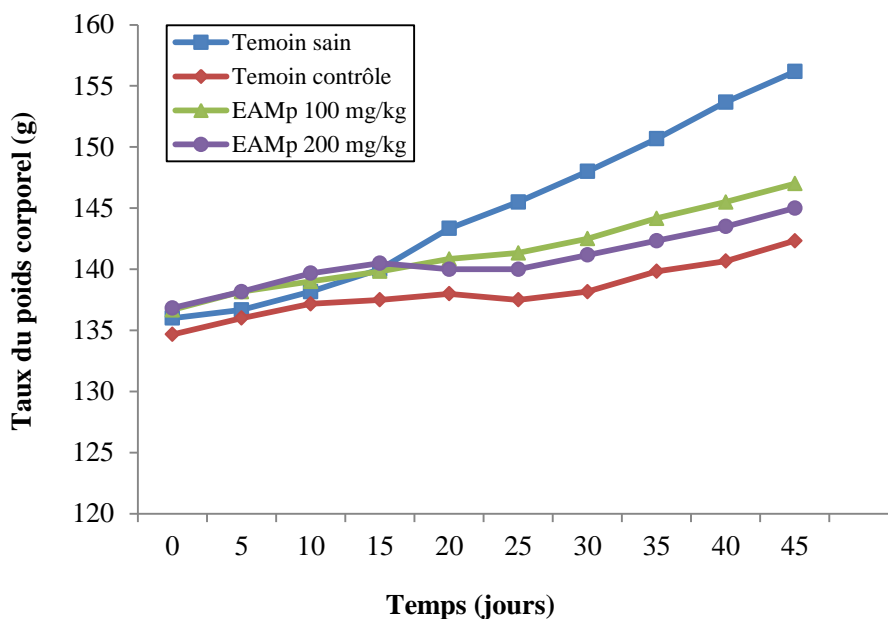


Figure 31: Effet de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* sur le poids corporel des rats arthritique et les rats arthritique traité.

L'administration de 100 mg/kg et 200 mg/kg de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* par voie orale chez les rats arthritiques n'a montré aucun significatif sur le poids corporel des rats arthritique et les rats arthritique traité, malgré une légère amélioration comparée au témoin arthritique non traité.

8.4.4. Effet sur certains paramètres cellulaires et sériques

Les résultats présentés dans le tableau 4 ont montré une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) du nombre des leucocytes accompagnée d'une élévation du taux sérique de la CRP chez les rats du groupe témoin arthritique par rapport au témoin sain. Cela signifie une forte inflammation systémique.

Tableau 6: Taux des cellules immunitaires chez les différents groupes testés. EAMP : extrait aqueux de *M. pubescens*,

Groupes	GR (10 ⁶ cells/mm ³)	GB (10 ³ cells/mm ³)	CRP (mg/L)
Témoinsain	6,31 ± 0,25	6,78 ± 0,23	1,42 ± 0,16
Témoin arthritique	4,06 ± 0,24 [#]	14,98 ± 0,40 ^{# ##}	7,29 ± 0,34 ^{# ##}
EAMP (100 mg/kg)	4,20 ± 0,31 ^{ns}	13,60 ± 0,30 ^{ns}	6,39 ± 0,42 ^{ns}
EAMP (200 mg/kg)	5,45 ± 0,28 ⁺	9,96 ± 0,40 ⁺⁺	3,77 ± 0,22 ⁺⁺

[#]: par rapport au témoin sain, ⁺: par rapport au témoin arthritique

A 45 jours du traitement avec l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* on a observé une diminution mais non significative du nombre des leucocytes chez les rats traité par la dose 100 mg/kg. La dose 200 mg/kg diminue significativement (p<0,01) le taux des leucocytes et de la CRP.

8.4.4. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH)

Les résultats présentés dans la figure 32 montrent qu'après 45 jours, la dose 100 mg/kg inhibe l'inflammation à un taux de 23,37% alors que la dose de 200 mg/kg cause un pourcentage d'inhibition de 63,6%.

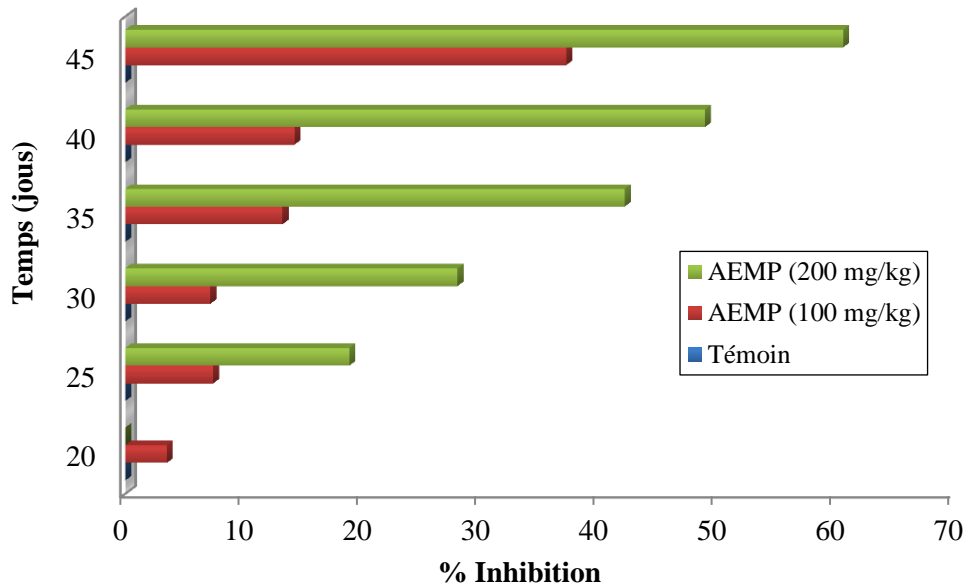


Figure 32 : Pourcentages d’inhibition de l’œdème des pattes des rats.

Les modèles animaux d’arthrite, essentiellement les modèles murins, sont utilisés soit pour déterminer les mécanismes physiopathologiques de la PR, soit pour tester de nouvelles cibles thérapeutiques et valider des traitements potentiels. Ils présentent de nombreuses caractéristiques analogues à la PR humaine. La majorité des modèles murins utilisés pour étudier la PR présentent des similitudes avec la PR humaine et aident à prédire l’efficacité des agents thérapeutiques. Cependant, d’importantes différences existent avec la PR humaine. En effet, l’arthrite chez les souris progresse très rapidement par rapport à la maladie humaine. De plus, en réponse à l’inflammation articulaire, les souris ont tendance à développer une résorption osseuse beaucoup plus marquée que l’Homme.

Plusieurs approches ont été développées chez la souris pour induire l’arthrite soit par immunisation ou par injection. Le modèle d’arthrite induite au collagène (CIA) est le plus connu et certainement le plus apprécié car il implique l’immunisation avec une composante du cartilage : le collagène. La forte incidence des anticorps anti-CII, particulièrement au cours des premières

phases de développement de la PR, indique que le CII est l'un des auto-antigènes majeurs impliqués dans l'initiation de l'inflammation articulaire (Kim *et al.*, 2004).

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle murins d'arthrite afin d'explorer cette propriété anti-inflammatoire du EAMP et nous avons montré que EAMP administré par voie orale pendant 45 jours à une dose de 200 mg/kg diminué l'arthrite développée par ce modèle. Cette diminution de l'arthrite se manifeste par l'inhibition de l'inflammation (diminution du gonflement des articulations et inhibition de l'infiltration des cellules immunitaires).

La littérature est remplie de documentation scientifique concernant les plantes médicinales qui ont le potentiel de guérir diverses maladies humaines (Lai et Rov, 2001). Ainsi, le futur sous herbe favorisera encore la fabrication de produits pharmaceutiques obtenus à partir des plantes médicinales car ils sont sûrs et fiables comparés à des drogues de synthèse, non seulement coûteuses mais aussi néfastes (Gordon et David, 2001). Les antiarthritiques naturellement isolés agissent en supprimant les différents types de médiateurs inflammatoires impliqués dans le processus inflammatoire (Ekambaram *et al.*, 2010). Ainsi, dans cette étude, deux différentes méthodes *in vitro* et *in vivo* ont été adaptées pour évaluer la propriété antiarthritique de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens* avec cette croyance que le traitement par extraits libère diverses substances bioactives qui pourraient jouer un rôle dans la production d'une activité pharmacologique particulière. La stabilisation de la membrane lysosomale est importante pour limiter la réponse inflammatoire en inhibant la libération des constituants lysosomaux des neutrophiles activés. Ces constituants lysosomaux des neutrophiles comprennent des enzymes bactéricides et une protéase qui, lors de la libération extracellulaire, provoquent une inflammation et une détérioration supplémentaires des tissus. La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale (Chou, 1997) et sa stabilisation implique que les extraits

puissent également stabiliser la membrane lysosomale. AEMP peut éventuellement inhiber la libération de la teneur en lysosomes des neutrophiles sur le site de l'inflammation.

La dénaturation des protéines est l'une des causes bien documentées de l'inflammation dans des conditions telles que la polyarthrite rhumatoïde (Mizushima et Kobayashi, 1998). La production d'auto-antigènes dans certaines maladies rhumatismales peut être due à la dénaturation *in vivo* des protéines (Singh *et al.*, 2011; Kokila *et al.*, 2013). Certains médicaments anti-inflammatoires ont montré une capacité dépendante de la dose à inhiber la dénaturation des protéines. Des résultats similaires ont été observés à partir de nombreux rapports d'extraits de plantes (Sakat *et al.*, 2010). Le mécanisme de dénaturation implique probablement une altération de la liaison électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure. D'après les résultats de la présente étude, on peut affirmer que l'AEMP est capable de contrôler la production d'antigène auto et inhibe la dénaturation de la protéine dans la maladie rhumatismale. Son effet a été comparé au diclofénac sodique standard. La production d'antigènes auto dans certaines maladies arthritiques peut être due à la dénaturation des protéines et à l'action de la lyse membranaire. Le pourcentage maximal d'inhibition de la dénaturation des protéines a été observé à 63,08% à 1500 µg / ml.

Des signes classiques d'arthrite sévère ont été observés avec l'administration intradermique de collagène de type II, y compris une atteinte articulaire symétrique impliquant généralement les pattes postérieures, un gonflement, une rougeur et un érythème sur les articulations (Asquith *et al.*, 2009; Brand *et al.*, 2007). Les symptômes caractéristiques de la PR comprennent la fièvre, la fatigue et la perte de poids (Lee *et al.*, 2001). Le poids corporel des rats CIA diminue progressivement après l'immunisation et il sera au plus bas après trois semaines d'immunisation (Trentham *et al.*, 1997 ; Nagatomo *et al.*, 2010). Notre étude a montré une perte significative de poids corporel autour de 45 jours chez les rats CIA par rapport au contrôle sain. L'extrait aqueux

de *Matricaria pubescens* (les deux doses) a montré une récupération significative du poids corporel au cours des 45 jours de traitement par rapport à leurs témoins arthritiques.

Des changements dans le poids corporel ont également été utilisés pour évaluer l'évolution de la maladie et la réponse au traitement par des médicaments anti-inflammatoires. À mesure que l'incidence et la gravité de l'arthrite augmentaient, les changements dans le poids corporel des rats se sont également produits au cours de la période expérimentale. La perte de poids corporel pendant l'arthrite a également été confirmée par des observations antérieures sur les modifications des activités métaboliques des rats malades. Dans l'arthrite, il y a une augmentation légère à modérée du nombre de globules blancs due à la libération de la réponse inflammatoire, augmente la production de granulocytes et de macrophages dans l'inflammation est significativement supprimée par l'extrait aqueux par rapport au contrôle arthritique, comme le montre la réduction significative du nombre total de globules blancs, de globules rouges et d'hémoglobine. Cette observation fournit des preuves suggérant l'effet anti-inflammatoire potentiel de *Matricaria pubescens* contre l'arthrite induite par le collagène. La diminution significative des symptômes de l'arthrite, de l'épaisseur des pattes et de la normalisation du poids corporel et des paramètres hématologiques chez les rats arthritiques traités par *Matricaria pubescens* postule l'effet anti-inflammatoire possible de l'extrait aqueux de *Matricaria pubescens*.

D'après les résultats de l'étude, on peut conclure que l'extrait de *Matricaria pubescens* possède une propriété antiarthritique. Cependant, il faut essayer de mieux comprendre l'extrait comme ayant une meilleure activité en quête de candidat actif ou molécule chimique qui est principalement responsable de cette activité *via* une expérimentation détaillée.

Conclusion et perspectives

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée dans ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées par la plante non seulement comme des agents biologiques comme les bactéries, virus, herbivores et prédateurs mais aussi comme des agents chimiques tels que les oxydants et pro-inflammatoires. Les molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vue les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse à savoir le BHA et le BHT.

L'objectif primordial assigné par cette étude s'inscrit dans ce même contexte. nous sommes intéressés à l'étude phytochimique et du pouvoir évaluer l'activité antibactérienne, antioxydante et anti-inflammatoires de différents extraits bruts de *Matricaria pubescens* L.

Les tests phytochimiques réalisés par les réactions de caractérisation ont permis de mettre en évidence des flavonoïdes, des tanins, des stérols et triterpènes, des saponoside, coumarines et des glycosides dans la partie aérienne de la plante avec un absence des alcaloïdes.

Les extractions des réalisées par divers solvants (eau, acétone, méthanol) ont été avec des rendements différents (infusé, acétone et méthanol), dont le rendement le plus remarquable est celui de l'extrait aqueux (16.10%).

La teneur des polyphénols et des flavonoïdes totaux est variable entre les différents extraits de bruts étudiés. La teneur la plus élevée des polyphénols est constatée dans acétone avec une teneur de 129,12 mg EGA/g suivi par les l'extrait aqueux. Concernant les

flavonoïdes, la teneur la plus élevée est constatée dans l'extrait méthanolique (78,13 mg EC/g). Ces résultats reflètent les rendements élevés et la richesse de la partie aérienne de la plante en polyphénols et flavonoïdes.

Les profils de l'activité anti radicalaire révèlent que les extraits testés possèdent une activité dose-dépendante. L'extrait acétonique de *Matricaria pubescens* a montré un pouvoir antioxydant plus important par rapport aux autres extraits.

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé a montré que les extraits de *M. pubescens* sont pourvus d'effet inhibiteur plus ou moins important sur les souches testées

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée *in vitro* par le test de l'inhibition de la dénaturation du BSA et la stabilisation des membranes des globules rouge humains. Dans la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines, les extraits de *M. pubescens* ont montré une capacité intéressante pour réduire le taux de la dénaturation des protéines, un maximal taux d'inhibition a été enregistré avec l'extrait aqueux avec une valeur de 63,08% à la dose 1,5 mg/ml. Alors que dans la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humains, le *M. pubescens* présente une bonne capacité de protection de la membrane et un maximal taux d'inhibition de la lyse est enregistré avec l'extrait aqueux avec 72,4% à la dose 1,5 mg/ml.

L'activité anti-inflammatoire *in vivo* a été examinée pour l'extrait aqueux de la plante par deux modèles animaux: (1) une inflammation aiguë provoqué par la carragénine chez les souris et (2) chronique provoque par le collagène type II chez les rats. Dans le modèle souris, la dose de 300 mg/kg a révélé un effet inhibiteur de l'extrait aqueux administré par voie intrapéritonéale dès la première heure qui suit l'injection de la carragénine avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 6,77 %. Cette activité augmente progressivement jusqu'à la quatrième heure (89,43%). Une diminution significative ($p < 0.05$) du nombre des leucocytes, lymphocytes

et les granulocytes a été observé chez les souris traitées en comparaison avec le groupe témoin positif.

Après l'induction de l'arthrite par le collagène type II, le traitement avec l'extrait aqueux du *Matricaria pubescens*, a provoqué une diminution significative ($p < 0,05$) du volume de l'œdème des pattes des rats traités par la dose 200 mg/kg. Cette amélioration est accompagnée par une légère diminution dans le nombre des leucocytes et dans le taux de CRP chez les rats traités par 100 mg/kg. Alors que la dose 200 mg/kg diminue très significativement ($p < 0,01$) le taux des leucocytes et de la CRP montrant l'effet dose dépendant de l'extrait.

Les résultats de cette étude nécessitent d'être approfondis par un ensemble de travaux en perspectives :

- étude phytochimique avancée
- fractionnement des extraits et identification des molécules responsables des différentes activités biologiques en utilisant des techniques d'identification plus performantes.
- Evaluation d'autres activités biologiques telles que l'effet anticancéreux par d'autres méthodes comme la méthode de cytotoxicité.
- Etude du mode d'action des substances ou fractions isolées
- Evaluation de la toxicité éventuelle de la plante en vue d'une utilisation sûre.

References bibliographiques

- Ahmed, A.A., Abou Elela, M.A. (1999). Highly oxygenated bisabolenes and an acetylene from *Matricaria aurea*. *Phytochemistry*. **51**: 551-554.
- Amakura, Y., Yoshimura, M., Yamakami, S., Yoshida, T., Wakana, D., Hyuga, M., Hyuga, S., Hanawa, T., Goda, Y. (2013). Characterization of Phenolic Constituents from *Ephedra* Herb Extract. *Molecules*;18:5326-5334.
- Amaral, A.C.F., Kuster, R.M., Gonçalves, J.L.S., Wigg, M.D. (1999). Antiviral investigation on the flavonoids of *Chamaesyce thymifolia*. *Fitoterapia*. **70**: 293-295.
- Amarti, F. (2015). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*;14(1):141-148.
- Anné, S., Agarwal, M., Nair, M.P., Schwartz, S.A., Ballow, M., Kandaswami, C., Middleton, E.Jr. (1994). Inhibition of endotoxin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte adhesion to endothelial cells by plants flavonoids quercetin. *J. Allergy Clin. Immunol.*;93:p 276.
- Arrar, L., Diafet, A., Charef, N., Khennouf, S, Baghiani, A. (2013). Preventive and curative effect of the methanolic extract of *Ajuga iva* on collagen induced arthritis in rats. *Pharmacognosy Communications* .Volume 3 | Issue 2 | Apr–Jun 2013
- Asquith, D.L., Miller A.M., McInnes, I.B., Liew, F.Y. (2009). Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*;39:2040-2044.
- Atkin, M.A., Gasper, A., Ullegaddi, R., et al. (2005). Oxidative susceptibility of unfractionated serum or plasma : response to antioxidants *in vitro* and to antioxidants supplementation. *Clin Chem*, , **51**, 2138-2144.
- Awah, F.M., Uzoegwu, P.N., Ifeonu, P., Oyugi, J.O., Rutherford, J., Yao, X.J., Fehrmann, F., Fowke, K.R., Eze, M.O. (2012). Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants. *Food Chem.*;131(4):1279-1286
- Azzi, R. (2013). Contribution à l'étude de plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel du diabète sucré dans l'Ouest algérien;enquête ethnopharmacologique:Analyse pharmaco-toxicologique de Figuier (*Ficus carica*) et de coloquinte (*Citrullus colocynthis*) chez le rat Wistar. Thèse de doctorat en Sciences. Université de Tlemcen, p 179.

- Babenko, N.A.; Shakhova, E.G. (2006). Effects of *Chamomilla recutita* flavonoids on age-related liver sphingolipid turnover in rats. *Experimental Gerontology*. **41**(1): 32-39.
- Bagad, Y.M., Umarmar, A.R., Tati, A.U., Surana, S.J. (2011). Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Bridelia airyshawii* (Euphorbiaceae). *J. Pharm. Res.*; **4**(5); 1326-1332.
- Baghiani. A., Ameni. D., Boumerfeg. S., Adjadj. M., Djarmouni. M., Charef. N. (2012). Studies of antioxidant and Xanthine oxidase inhibition potential of root and aerial parts of medicinal plants *Capparis spinosa* L. *Am J Med Sci*; **2**: 25-32.
- Barros, L., Cabrita, L., Boas, M.V., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2011). Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chem.*; **127**(4): 1600-1608.
- Bellakhdar, J. (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. *In: A Guide to Medicinal Plants in North Africa. IBIS Press.* 764 p
- Bellakhdar, J., Claisse, R., Fleurentin, J., Younos, C. (1991). Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*. **35**: 123.
- Bel-Rhlid R., Chênevert R., Piché Y. (2016). Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytologist*; **122**: 461-467.
- Benhouhou, S.S., Saadoun, N. (1986). Contribution à l'étude de la flore de la région de Béni-Abbès. *In: A Guide to Medicinal Plants in North Africa. University of Algiers.* p 241
- Bidet. D., Gaignault, J.C., Girard, P., Trotin, F. (1987). Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*. 89 - 97.
- Billing, J., Sherman, P.W. (1998) Antimicrobial Functions of Spices; Why Some Like it Hot. *Quarterly Rev. Biol.*; **73**(1): 3-49.
- Blaschke, S., Middel, P., Dorner, B.G., Blaschke, V., Klaus, M., Hummel, K.M., Kroczeck, R.A., Reich, K., Benoehr, P., Koziolok, M., Gerhard, A., Müller, G.A. (2003). Expression of activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related cytokine/lymphotactin and its functional role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; **48**: 1858-1872
- Bohlmann, F., Hartono, L., Jakupovic, J. (1995). Highly unsaturated amides from *Salmea scandens*. *Phytochemistry*. **24**(3): 595-596.

- Boissier, M.C., Assier, E., Falgarone, G. Bessis, N. (2008). Shifting the imbalance from Th1/Th2 toTh17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine* **75**, 373-375
- Boissier, M.C., Bessis, N., Falgarone, G. (2002). Options for blocking interleukin-1 in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*;**69**:351-354
- Bone loss, Roux, S., Orcel, P. (2016). Factors that regulate osteoclast differentiation: an update. *Arthritis Res*; **2**:451–456.
- Bonnaillie, C., Salacs, M., Vassiliova, E., Saykova, I. (2012). Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicules d'arachide (*Arachis hypogaea* L.). *Revue de Génie Industriel*;**7**:35-45.
- Boumerfeg. S., Baghiani. A., Messaoudi. D., Khennouf. S., Arrar. L. (2009). Antioxidant properties and xanthine oxidase inhibitory effects of *Tamus communis* L. root extracts. *Phytother Res*;**23**:283-88.
- Bounaga, N. (1999). Brac de la PRA. Plant genetic resources of the Sahara. *Ann. Inst. Nat. Agro. El Harrach*:**12**(1);79-94.
- Bourgeois, C.M., Mescle, J. F., Zucca, J. (1996). Microbiologie alimentaire, tome 1.Aspect microbiologique de la sécurité et la qualité alimentaire. Tec et Doc. Lavoisier. Paris France.
- Boutaghane, N., Kabouche, A., Touzani, R., Ahmad Maklad, Y., El-Azzouny, A., Bruneau, C., Kabouche, Z. (2010). GC/MS Analysis and Analgesic Effect of the Essential Oil of *Matricaria pubescens* from Algeria. *Natural Product Communications*. **5**(0): 1-3. Vol
- Boutry, N., Cotten, A. (2010). Apport de l'échographie dans les rhumatismes inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, pseudopolyarthrite rhizomélique et spondylarthropathies). *La Revue de Médecine Interne*:**31**;29–40
- Bouzouita , N ., Kachouri, N. F., Ben Halima, M., M. M. Chaabouni.,. Composition chimique et activités antioxydants, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *J. Soc. Chim. Tunisie*;**10**:119-125.
- Brand, D.D., Latham K.A., Rosloniec E.F. (2007). Collagen-induced arthritis. *Nat. Protoc.*:**2**;1269-1275.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1997). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*;**28**:25-30.

- Brennan, F.M., Mc Innes, I.B. (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*;118:3537-3545
- Bruhl, H., Cihak, J., Niedermeier, M., Denzel, A., Rodriguez Gomez M., Talke, Y., Goebel, N., Plachý, J., Stangassinger, M., Mack, M. (2009). Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*;60:1352-1361
- Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Tec & Doc (4th Ed.), Paris, 1268 p.
- Bruneton. J. (1999). Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales. Édition : Techniques et Documentation Lavoisier, Paris.
- Caillet, S., Lacroix, M., (2007). Les Huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leur applications potentielles en alimentaire. Laboratoire de recherche en sciences appliquées à l'Alimentation (RESALA).INRS-Institut Armand-Frappier, p.6-8.
- Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R. (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.*;70(2);93-103.
- Camille, M., Mireille, S.(2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences ; 27 : 405-12*
- Cantagrel, A., Degboéa, Y., Constantina, A., Davignona, J.L. (2017). TNF- α , interleukin-6 and interleukin-1,3 pivotal cytokines in rheumatoid arthritis pathogenesis. *Autoimmun. Rev.*;418:6
- Cascao, R., Rosario, H.S., Souto-Carneiro, M.M., Fonseca, J.E. (2010). Neutrophils in rheumatoid arthritis;More than simple final effectors. *Autoimmun. Rev.*;9:531-535.
- Cedergren, J., Forslund, T., Sundqvist, T., Skogh, T. (2007). Intracellular oxidative activation in synovial fluid neutrophils from patients with rheumatoid arthritis but not from other arthritis patients. *J Rheumatol.* **34**, 2162-2170
- Cho, J. Y., Baik, U.K., Jung, J.H., Park, M. (2000). In vitro anti-inflammatory effects of cynaropicrin, a sesquiterpene lactone, from *Saussurea lappa*. *European Journal of Pharmacology.* **398**: 399-407.
- Cho, K.j., Yun, C.H., Yoon, D.Y., Cho, Y.S., Rimbach, G., Packer, L., Chung, A.S. (2000). Effect of bioflavonoids extracts from the bark of *Pinus maritime* on proinflammatory

- cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; **168**:64-71.
- Cho, Y.G., Cho, M.L., Min, S.Y. & Kim, H.Y. (2007). Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.*; **7**:65-70.
- Choe, E., Min, D. B. (2005). Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *J. Food Sci.*; **70**(9):R142-R159
- Chou, C.T.(1997). The antiinflammatory effect of *Tripterygium wilfordii* hook on adjuvant-induced paw edema in rats and inflammatory mediators release. *Phytother. Res.*; **11**:152-157.
- Choy, E.H., Panayi, G.S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New Engl. J. Med.*; **344**:907-916
- Cordonnier, C., Meyer, O., Palazzo, E., de Bandt, M., Elias, A., Nicaise, P., Haïm, T., Kahn, M.F., Chatellier, G. (1996). Diagnostic value of anti-RA33 antibody, antikeratin antibody, antiperinuclear factor and antinuclear antibody in early rheumatoid arthritis; comparison with rheumatoid factor. *Br. J. Rheumatol.*; **35**:620-624.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Calabro, G., Dugo, L., De Sabro, A., van de Loo, F., Caputi, A.P. (2000a). Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am. Respir. Crit. Care Med.*; **162**:1859-1866.
- Cuzzocrea, S., Santagati, S., Sautebin, L., Mazzon, E., Calabro, G., Serraino, I., Caputi, A.P., Maggi, A. (2000b). 17 β -Estradiol anti-inflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. *Endocrinol.*; **141**(4):1455-1463.
- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Hake, P., Salzman, A., Szabo, C. (1998). Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radic. Biol. Med.*; **24**(3):450-459.
- Dangles, O. (2012). Antioxidant activity of plant phenols: chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*. **16** : 692-714.
- Dangles, O., Dufour, C. (2008). Recent advances in Polyphenol Research. **Chapter 3**: 67-87.
- Dangles, O., Dufour, C. (2006). Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Eds Andersen O. and Markham K. CRC Press, Boca Raton. **Chapter 9**: p 443-469.

- Dangles, O., Dufour, C. (2008). Flavonoid-protein binding processes and their potential impact on human health. In *Recent Advances in Polyphenol Research. Blackwell Publishing: Oxford.* **01**: 67-87.
- Das, H.C., Wang, J.H., Lien, E.J. (1994). Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. *Progress in Drug Research.* 133 – 136.
- Das, M., Ram, G., Singh, A., Mallavarapu, G.R., Ramesh, S., Ram, M., Kumai, S. (2002). volatils constituants of different plant parts of *Matricaria recutita L. rausch* grown in the indo gangetic plains. *Flavour and Fragrance.* **17**(1): 12.
- Dawson, J., Sedgwick, A.D., Edwards, J.C.W., Lees, P. (1991). A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *Int J Tissue React*:13(4);171-185.
- Day, A.J., Bao, Y., Morgan, M.R.A., Williamson, G. (2000). Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine.* **29**: 1234 1243.
- Delaporte, R.H., Sarragiotto, M.H., Takemura, O.S., Sanchez, 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. *J. Ethnopharmacol.*; **95**:229–233.
- Delattre, J., Beaudeau. J.L., Bonnefont-Rousselot., D. (2005). Radicaux libres et stress oxydant, aspects biologiques et pathologiques. Première édition. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 547 pages.
- Delille, L. (2007). Les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI. Alger, p122
- Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A.A., Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Review life sciences.* **65**: 337-353.
- Diallo, D., Sanogo, R., Yasambou, H., Traore, A., Coulibaly, K., Maiza, A. (2004). Etude des constituants des feuilles de *Ziziphus mauritiana* Lam (Rhamnaceae) utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète au Mali, *C.R. Chimie*; **7**: 1073-1080.

- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*; **97**(4):654-660.
- Doskotch, R.W., Beal, J.L. (1990). The isolation and identification of the numbing principle in *Chrysanthemum anethifolium*. *Loydia*. **33**(3): 393-394.
- Droge, W. (2016). Free radicals in the physiological control of cell function, *Cellular Physiol. Rev.*; **82**:47-95.
- Edwards, J.C. (2016). Development and differentiation of synovial fibroblasts in auto immune arthritis. *Arthritis Res.*; **2**:344–347.
- Ekambaram, S., Perumal, S.S., Subramanian, V. (2010). Evaluation of antiarthritic activity of *Strychnos potatorum* Linn seeds in Freund's adjuvant induced arthritic rat model. *BMC Comp. Alt. Med.*; **10**:56.
- Eklund, K.K. Humphries, D.E., Xia, Z., Ghildyal, N., Friend, D.S., Gross, V., Stevens, R.L. (1997). Glucocorticoids inhibit the cytokine-induced proliferation of mast cells, the high affinity IgE receptor-mediated expression of TNF-alpha, and the IL-10-induced expression of chymases. *J. Immunol.*; **158**:4373-4380
- Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R.(2016).Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.*; **111**:61–66.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*; **270**:108-115.
- Fiorucci, S., Golebiowski, J., Cabrol-Bass, D., Antonczak, S. (2007). DFT study of quercetin activated forms involved in antiradical, antioxidant, and prooxidant biological processes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **55**: 903-911.
- Foulquier, C. (2007).Genèse des cibles des auto- anticorps anti-protéines citrullinées dans le tissu synovial rhumatoïde : peptidyl-arginine désiminases et fibrine citrullinée. U.F.R. Sciences de la Vie et de la Terre (SVT) École Doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies.; Université Paul Sabatier Toulouse III, p 251.

- Gabay, C. (2004). Etude rétrospective sur l'évolution clinique d'une cohorte de patients avec polyarthrite rhumatoïde traitées par des inhibiteurs du TNF- α , Université de Genève, Faculté de Médecine, Département de Médecine Interne, Service de Rhumatologie, p 64.
- Gaussen, H., Leroy, H. F. (1999). Précis de Botanique (végétaux supérieurs), 2nd Ed. éditeur elsevier / masson. p592.
- Gherib, M., AtikBekkara, F., Bekhechi, C., Bighelli, A., Casanova, J., Tomi, F. (2014). Composition and antimicrobial activity of the essential oil from Algerian *Warionia saharae* Benth.& Hook. *J. Ess. Oil Res.*; **26**(5):pp. 385-391.
- Ghosh, S., Saha, K., Dasgupta, S.C., Gomes, A. (2015). In vitro and In vivo Anti-Arthritic and Anti-Inflammatory Activity of *Bungarus Fasciatus* Venom. *J. Toxins*; **2**(1);1-5.
- Giesbrecht, A.M., de Alvarenga, M.A., Gottlieb, O.R., Gottlieb, H.R. (1994). (2E, 4E)- N-isobutyl-9-piperonyl-nona-2 ,4-Amide dienoic de *Ottonia anisum* . *Planta medica*. **43**(12): 375-377
- Giordani R. Kaloustian J. (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *J. Phytother.*; **3**:121-124.
- Giordani, R., Kaloustian, J. (2006). Action anticandidosique des huiles essentielles : leur utilisation concomitante avec des médicaments antifongiques. *J Phytotherapie* .**3**,121-124
- Gordon, M.C., J.N. David.(2001). Natural product drug discovery in the next millennium. *Pharm. Biol*; **39**:8-17.
- Gotis-Graham, I., Smith, M.D., Parker, A., McNeil, H.P. (1998). Synovial mast cell responses during clinical improvement in early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*; **57**:664-671
- Goto, T., Kondo T. (1991). Structure and molecular stacking of anthocyanins Flower color variation. *Angewandte Chemie* .**30**: 17-33.
- Goupy P., Dufour C., Loonis M., Dangles O. (2003). A quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **51**(3): 615-622.
- Greger, H., Hofer, O. (1984). On the pungent principle of *Matricaria pubescens*. *Phytochemistry*. **23**(5): 1174.

- Grisar, J. Hahn, P., Brosch, S., Peterlik, M., Smolen, J.S., Pietschmann, P. (2001). Phenotypic characteristics of human monocytes undergoing transendothelial migration. *Arthritis Res.*; **3**:127-132.
- Gruber, B.L. et al. (1996). Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clin Immunol Immunopathol* **78**, 161-171
- Guignard, J.L. (1994). Abrégé botanique, 9^{ème} édition. Masson, Paris. p 204
- Guignard, J. L., Cossen, L., Henry, M. (1985). Abrégé de Phytochimie, Ed. Masson, Paris.
- Guignard, J.L. (1998). Abrégés de Botanique, Ed. Masson, Paris Milan Barcelone.
- Guiraud, J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Édition DUNOD Paris France. pp 431,652.
- Haas, C.S. Amin, M.A., Ruth, J.H., Allen, B.L., Ahmed, S., Pakozdi, A., Woods, J.M., Shahrara, S., Koch, A.E. (2007). In vivo inhibition of angiogenesis by interleukin-13 gene therapy in a rat model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*; **56**:2535-2548
- Haddad. J.J. (2014). Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors, *Cell Signal*; **14**(11):879-97.
- Haghi, G., Hatami, A., Safaei, A., Mehran, M. (2014). Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV. *Research in Pharmaceutical*
- Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*. **52**:253-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine. 2^{ème} ed. Oxford, UK : Clarendon,.
- Hammiche, V., Maiza, K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J. Ethnopharmacol.*; **105**:358-367
- Harborne, J.B., Swain, T. (2000) Perspectives In Phytochemistry, Academic Press, London, New York.
- Havsteen, B-H. (2002). The biochemistry and medical significance of flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*. **96**: 67-202.
- Hayer, S., Redlich, K., Maier, A., Dunstan, C.R., Tohidast-Akrad, M., Lang, S.m Türk, B., Pietschmann, P., Woloszczuk, W., Haralambous, S., Kollias, G., Steiner, G., Smolen, J.S., Schett, G. (2002) Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum.*; **46**:785–792.

- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. **13**: 572- 584.
- Hennebelle, T. (2006). "Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de Lamiales productrices d'antioxydants." *Chimie Organique et Macromoléculaire*. These de Docotrat; Universite de Lille1. p 303.
- Hueber, A.J. et al. (2010). Mast cells express IL-13 in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* **184**, 3336-3340.
- Hunter, C.A., Jones, S.A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.*; **16**:448–57.
- Inouye S., Abe S. (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*; **5**(1):2–4.
- Isenberg, D.A., Garrod, T., Farrow, S., Ioannou, Y., Bird, H., Cheung, N., Williams, B., Hazleman, B., Price, R., Yoshizaki, K., Nishimoto, N., Kishimoto, T., Panayi, G.S. (2016). Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum.*; **46**:3143–3150.
- Jay, D.B., Papaharalambus, C.A., Seidel-Rogol, B., et al. (2008). Nox5 mediates PDGF induced proliferation in human aortic smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* ; **45** : 329-35.
- Jeantet, R., Roguennec, T., Schuck P., Brule, G. (2007). Science des aliments, *Biochimie, Microbiologie, Procédés, produits*. Vol 2, Technologie des produits alimentaires, TEC & DOC, Paris,,: pp 456.
- Ji, H. Allison, P., Koichiro, O., Adriana, O. L., Veronique, D., Claude, D., Ellen, G., Diane M., Christophe, B. (2002). Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J. Exp. Med.*; **196**:77-85
- Jilroy, D., Colvillr-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., Willoughby, D.A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.*; **5**(6):p 698-701.
- Jones W.P., Kinghorn A.D. (2015). Extraction of plant secondary metabolites. Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa). 323-411

- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemistry Society*. **116**: 4846-4851.
- Kaddem, S. (2011). La polyarthrite rhumatoïde: de nouvelles révolutions thérapeutiques. 225-228.
- Kaplan, C. Juan, C. V., Raman, C., Hermann, E., Katalin, M., Tibor, T. G., Alison, F. (2002). Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis. *Arthritis Res* ;4(1) :54-58
- Kasai, R., Shingu, T., Wu, R.Y., Hal, I.H., Lee, K.H. (1992). Anti tumor agents 57. The isolation and structural elucidation of microhelenin a new anti leukemic norpseudoguaianolide and microhelenin from *Helenium microcephalum*. *Journal of Natural Products*. **45**(3): 317-320.
- Kaur, C., Kapoor, H.-C.(2002). Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Intern. J. Food Sci.Tech.*;**37**(2):153-161.
- Kawanaka, N., Masahiro, Y.,Tetsushi A.,Yoshitaka, M., Akira O., Masanori, K., Mitsuhiro, I., Akiko, U.,Yasukazu, O., Hirofumi, M. (2002). CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*;**46**:2578-2586
- Kim, W.U., Cho, M.L., Young, O. Jung, M.D., Min, S.Y., Park,S.W., Min, D.J., Yoon, J.H., Kim, H.Y. (2004).Type II collagen autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Am. J. Med. Sci.*;**327**:202-211.
- Koba, K., Sanda, K., Raynaud, C., Nenonene, Y. A., Millet, J., Chaumont, J.P. (2004). Activités antimicrobiennes d'huiles essentielles de trois *Cymbopogon* sp africains vis-à-vis de germes pathogènes d'animaux de compagnie. *Ann. Méd. Vét*, **148**, 202-206
- Kokila, N., Radha, R., Jayshree, N. (2013). *In vitro* Antioxidant and antiarthritic activity of polyherbal formulation. *IJPI'S Journal of Pharmacognosy and Herbal Formulation*;**13**(3):10-15.
- Koleva, I.I., Teris, A.B., Jozef, P.H., Linssen, A.G., Lyuba, N.E. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis*;**13**(1):8-17.
- Ksouri, R., Abdelly, C. (2017). Activité antioxydante et contenu en polyphénols dans les différents organes de l'artichaut sauvage, *Cynara cardunculus*. *Revue des Régions Arides*;**41**(1):341-344

- Kunde, R., Isaac, O. (1999). On the flavones of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) and a new acetylated apigenin-7-glucoside *Planta medica*. **37**(2): 124-130.
- Kuroki, T., Shingu, M., Koshihara, Y., Nobunaga, M. (1994) Effects of cytokines on alkaline phosphatase and osteocalcin production, calcification and calcium release by human osteoblastic cells. *Br J Rheumatol* **33**, 224-230.
- Lai, P.K., Rov, C.J. (2004). Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Curr. Med. Chem.*;11(11):234-238.
- Lee, D.M. et al. (2001). Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science*;297:1689-1692
- Léger, C. (2006). Oxydations, substances à fonctions antioxydantes et stress oxydatif : relations avec le vieillissement – revue critique. *OCL* ; **3** : 182-95.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.*;125(2):288-306.
- Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. **125**: 288-306.
- Lin, C., Chen, C., Liang, Y., Lin, J. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **294**: 167-172.
- Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2006). Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *J. Sci. Food Agric.*;86(3):477-485.
- Lubberts, E., Leo, A.B., Joosten, M. C., Liduine, B., Birgitte, O., Christina, J.J. C. R., Carl D. R., Pierre M., Wim, B. B. (2000). IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J. Clin. Invest.*;105:1697-1710
- Lucarini, M., Mugnaini, V., Pedulli, G.F. (2002). Bond dissociation enthalpies of polyphenols: the importance of cooperative effects. *Journal of Organic Chemistry*. **67**: 928-931.
- Ludke, A.R., Al-Shudiefat, A.A., Dhingra, S., et al. (2009). A concise description of cardioprotective strategies in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* ; **87** : 756-63.

- Ma, Y., Pope, R.M. (2005). The role of macrophages in rheumatoid arthritis. *Curr. Pharm. Des.*; **11**:569-580
- Maclé, M. (2012). La Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte, place et rôle du pharmacien d'officine dans sa prise en charge et la délivrance des biothérapies à l'officine. U.F.R de Médecine et de pharmacie de ROUEN. p247.
- Makhloufi, A. (2013). Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen. p166.
- Manthey, J.M. (2000). Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirc.*; **7**:28-34.
- Mariani, T.J., Zelko, I.N., Folz, R.J. (2014). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Radic. Biol. Med.*; **33**(3):p. 337.
- Martinez, M. T. (2004). Valorisation d'hydrolysats de co-produits de crevettes : étude de l'activité antiradicalaire et antioxydante, fractionnement des substances actives. Effet de la glycation. These Doctorat;188.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*; **16**(10):577-586.
- Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C., Mathis, D. (1999) Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme. *Science*, **286**, 1732-1735.
- Mazat, J.P., Ransac, S. (2010). Le complexe *bcl* de la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne selon l'hypothèse du cycle Q de Mitchell. La preuve par une approche stochastique. *Med Sci (Paris)* ; **26** : 1079-86.
- McCall, M.R., Frei, B. (1999). Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans. *Free Radic. Biol. Med.*; **26**(7-8):1034-1053.
- Mckay, D.L., Blumberg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita*). *Phytotherapy Research*. **20**(7): 519-530.
- Mebarki, L., KaidHarche, M., Benlarbi, L., Rahmani, A., Sarhani, A. (2013). Phytochemical analysis and antifungal activity of *Anvillea radiata*. *World Appl. Sci. J.*; **26**(2):165-171.

- Memelink, J., Verpoort, R., Kigine, J.W. (2001). Organisation of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism.
- Middleton, E.J.R. Kandaswami, C., Heoradies, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol. Rev.*; **52**:673-751.
- Mirunalini, S., krishnaveni, M. (2011). Coumarin: A Plant derived Polyphenol with wide Biomedical Applications. *International Journal of PharmTech Research*. 3(3): 1693-1696.
- Mizushima, Y., Kobayashi, M. (1998). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with same biologically active proteins. *J. Pharm. Pharmacol.*; **20**(1):169-173.
- Montoro, P., Tuberoso ,C.I.G., Perrone, A., Piacente ,S., De ,Feo. V., Cabras, P., Pizza, C. (2006). Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *Journal of Chromatography*:112;232-240. (b).
- Morel, J., Miossec, P., Combe, B. (2004). Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *EMC-Rhumatologie Orthopédie*; **17**:218–230.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*: **26**;2231-2234.
- Morteza, Jarrahi. (2008). An experimental study of the effects of *Matricaria chamomilla* extract on cutaneous burn wound healing in albino rats. *Natural Product Research*. **22**(5): 422-427.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Manuel Dominguez, J., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez M. J., Carlos Parajo, J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*; **72**(2):145-171.
- Moussaid, M., Elamrani, A.A., Berhal, C., Moussaid, H., Bourhiml, N., Benaissa, M. (2012). Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the Lamiaceae family; *Marrubium vulgare* (L.) and *Origanum majorana* (L.). *International Journal of Natural Products Research*: **1** (1);11-13.

- Mubashir, H.M., Iqbal,Zargar. M., Bahar,Ahmed. A., Saroor, A.K., Shamshir, K., Singh, P. (2009). Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous Extract of Marrubiumvulgare L. *Journal of Research and Development*:9;53-56.
- Myers, C. (1998). The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Semin Oncol* ; **25** : 10-4.
- N'Guessan, A. H. O., Dago Déliko, C. E., Mamyrbékova-Békro, J. A., Békro, Y. A. (2011). Teneurs en composés phénoliques de 10 plantes médicinales employées dans la tradithérapie de l'hypertension artérielle, une pathologie émergente en Côte d'Ivoire. *Revue de génie industriel*;6:pp. 55- 61.
- Nagao, A., Seki, M., Kobayashi, H. (1999). Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63(10), 1787-1790.
- Nagatomo, F., N. Gu, H. Fujino, T. Okiura, F. Morimatsu, I. Takeda, A. Ishihara. (2010). Effects of exposure to hyperbaric oxygen on oxidative stress in rats with type II collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Med*:10;7-13.
- Nathan, C.(2006).Neutrophils and immunity;challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*;6:173-182
- Nevot P., Phillipon A., Paul G. (2002). Agents antibactériens : antibiotiques, antibiomimétiques, *in Pharmacologie clinique, bases de la thérapeutique*. Expansion Scientifique Française, 1ere ed., Tome 2, 1223-1234.
- Ossipov, M. H.,Kovelowski, C. J.,Porreca, F. (1995). The increase in morphine antinoceptive potency produced by carrageenan-induced hindpaw inflammation is blocked by nalttrindole, a selective delta-opiodantagonist .*Neuroscience Letter*;184:173-176.
- Ould el hadj, M. D., Hadj-Mahammed, M., Zabeirou, H.(2003).Place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région d'Ouargla. *Courrier du Savoir – N°03*, Janvier, 47-51
- Ozenda, P. (2004). Flora and vegetation of the Sahara.Ed.CNRS, Paris.p.662 in *Journal of Medicinal Plants Research*:6(16);pp. 3124-3128.
- Packer K.J. (2015).Protective role of vitamin E in biological systems, *Am. J. Clin.Nutr*;53:p. 1050S.

- Panfili, G., Fratianni A., Irano, M. (2003). Normal phase high-performance liquid chromatography method for the determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 51(14):3940-3944.
- Paul G., Philippon A., Nevot P. (1993). Méthodes d'étude des antibiomimétiques, interprétation des résultats de laboratoire, in *Pharmacologie clinique, bases de la thérapeutique*. Expansion Scientifique Française, 1ere ed., Tome 2, 1243-1257
- Pettit, A.R. et al. (2007). Identification and isolation of synovial dendritic cells. *Methods Mol Med* :136 ; 165-181.
- Picman, A.K. (1996). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*. **14**: 255-281.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Production*. **63**: 1035- 1042.
- Pillon. F., Michiels. Y.(2014).Épidémiologie et physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *Nat Rev Rheumatol*; 17:518-522
- Prabakaran, D., Ashokkumar, N. (2012). Antihyperglycemic effect of esculetin modulated carbohydrate metabolic enzymes activities in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods*. **4**(4): 776-783.
- Pridgeon, C. et al. (2003). Natural killer cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients exhibit a CD56bright, CD94bright, CD158negative phenotype. *Rheumatology (Oxford)*; 42:870- 878
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.(2005) Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53(10):pp. 4290-4302.
- Quezel, F., Santa, S. (1983). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Vol. 1-2. Ed. CNRS, Paris France.
- Rached, W., Benamar, H., Bennaceur, M., Marouf, A. (2010). Screening of the antioxidant potential of some Algerian indigenous plants. *J. Biological. Sciences*, **10**(4): 316-324
- Rahmani M. (2005). Composition chimique de l'huile d'argan vierge. *Cahiers agricultures*, **14** (5) : 461-465.
- Raju, S.S., Nayak, B.S., Rao, A.V. (2007). Wound healing activity of *Matricaria recutita* L. extract. *Journal of Wound Care* . **16**(7): 298-302.

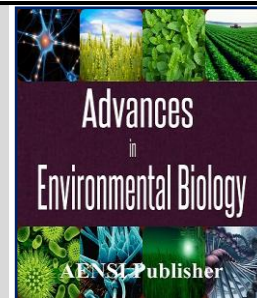
- Ramos, M.F.S., Santos, E.P., Bizarre, C.H.B., Mattos, H.A., Padilha, M.R.S. (1996). Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. *International Journal of Cosmetic Science*. **18**(3): 101.
- Raza, K. et al. (2006). Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*; **8**:R120
- Repčák, M., Suvák, M. (2013). Methyl jasmonate and *Echinothrips americanus* regulate coumarin accumulation in leaves of *Matricaria chamomilla*. *Biochemical Systematics and Ecology*. **47**: 38-41.
- Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*, Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc. 158 p.
- Robles, M., Aregullin, M., West, J., Rodriguez, E. (1995). Recent studies on the Zoon pharmacognosy, pharmacology, and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta Medica*. **61**: 199-203.
- Ruiz G. (2005). Extraction, Détermination Structurale et Valorisation Chimique de Phycocolloïdes d'Algues Rouges. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges Discipline : Chimie appliquée-Chimie de substances Naturelles. 258p.
- Ruiz-Irastorza, G., Crowther, M., Branch, W., Khamashta, M.A. (2010). Antiphospholipid syndrome. *Lancet*; **376**:1498–509
- Saeed, N., Khan, M.R., Shabbir, M. (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *Complementary and Alternative Medicine*, 12p.
- Safer, A.M., Al-Nughamish, A.J. (1999). Hepatotoxicity induced by the anti-oxidant food additive butylated hydroxyl toluen (BHT) in rats; An electron microscopical study. *Histology and Histopathology*; **14**:pp. 391-406.
- Sakat, S., A.R. Juvekar, M.N. Gambhire. (2010). *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *Int J Pharm Pharmacol Sci*; **2**(1):146-55.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *International Journal of Foods Science and Technology*; **8**(3);pp. 121-137.

- Sangeetha M, K Kousalya, R Lavanya, Cherukuru S Chamundeeswari D, Uma Maheswara R. (2011). *In-vitro* Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of Leaves of *Cleodendron Inerme*. *RJPBCS*; 2 (1):822-827.
- Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I.(2005). Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa). Pp;1-23.
- Schmidt, O., Magel, E., Frühwald, A., Glukhykh, L., Erdt, K. (2016). Influence of sugar and starch content of palm wood on fungal development and prevention of fungal colonization by acid treatment, 5.
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J. P. E., Williams, R. J., Cadenas, E., Rice-Evans C. (2002). MAPK signaling in neurodegeneration; Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging*; 23(5);861-880.
- Schulze-Koops, H., Kalden, J.R.(2001). The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*; 15:677-691
Sciences. 9(1): 31-37
- Seidel V.(2005). Initial and Bulk Extraction. Natural products isolation. *Humana Press*(Totowa). pp;27-37.
- Selvaraj, N., Bobby, Z., Sathiyapriya. V. (2006). Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an *in vitro* study on human erythrocytes. *Clin Chim Acta*, **366**, 190-195.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*; 25:1-26.
- Shendkar, A.K., Chaudhari, S.G., Shendkar, Y.K. (2014) .*In vitro* antiarthritic activity of *Withaniacoagul* and dunal fruits. *IAJPR*; 4:915-924.
- Shioji, K., Kishimoto, C., Nakamura, H., *et al.* (2002). Overexpression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity. *Circulation* ; **106** : 1403-9.
- Simunek, T., Stérba, M., Popelová. O., *et al.* (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* ; **61** : 154-71.

- Singh, M., P. Soni, N. Upmanyu, Y. Shivhare.(2011). *In-vitro* Anti-arthritic activity of *Manilkarazapota*Linn.*Asian J Pharm Tech*:1;123-4.
- Skaltse, H., Lazari, D., Panagouleas, C., Geogiadou, E., Garcia, B., Sokovic, M. (2000). Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaurea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry*. **55**(8): 903-908.
- Smith, A. R., Shenvi, S. V.,Widlansky, M.,Suh J. H., Hagen,T. M. (2004). "Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress." *Current Medicinal Chemistry*;11(9);1135-1146.
- Soderstrom, K. et al.(2010). Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *ProcNatlAcadSci U S A*;107:13028-13033
- Sohal, R.S., Mockett, R.J., Orr, W.C. (2015). Mechanisms Of Aging;An Appraisal Of The Oxidative Stress Hypothesis, *Free Rad. Biol. Med*, 33(5), P. 575.
- Song, F.L., Gan, R.Y., Zhang, Y., Qin, Xiao., Kuang, L., Li, H.B.(2010).Total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Selected Chinese Medicinal Plants. *Int. J. Mol. Sci*;11:pp. 2362 2372.
- Srivastava, J.K., Gupta, S. (2007). Antiproliferative and apoptic effects of chamomile extract in various human cancer calls. *Agricultural and Food Chemistry*. **55**(23): 9470-9478.
- Stasia, M.J. (2007). La granulomatose septique chronique X+. Un fabuleux modèle d'étude de l'activation du complexe NADPH oxydase. *Med Sci (Paris)*; **23** : 526-32.
- Stavric, B., Matula, T.I. (1992). Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health, Lipid soluble and antioxidants: *Biochemistry and clinical applications*. 274-294
- Subiza, J., Subiza, J.L., Alonso, M., Hinojosa, M., Garcia, R., Jerez, M., Subiza, E. (1990). Allergic conjonctivitis to chamomile tea. *Annals of Allergy*.**65**:127-132.
- Szekanecz, Z., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. & Koch, A.E. (1998).Chemokines in rheumatoid arthritis.*Springer SeminImmunopathol*;20:115-132
- Takatoshi, Murase.,Noriaki, Kume., Tadashi, Hase., Yusuke, Shibuya., Yoshinori, Nishizawa., Ichiro, Tokimitsu., Toru, Kita. (1999). Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *ArteriosclerThrombVascBiol*:19;1412-1420.
- Takemura, S. et al. (2001).Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis.*J Immunol*;167:1072-1080.

- Takizawa, M. et al. (2000). Production of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 is selectively enhanced by calcium pentosan polysulfate in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* ; **43** : 812-820 .
- Tighe, H., Heaphy, P., Baird, S., Weigle, W.O., Carson, D.A. (1995). Human immunoglobulin (IgG)induced deletion of IgM rheumatoid factor B cells in transgenic mice. *J Exp Med* **181**, 599-606
- Touafek, O. (2010). Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud algerien. Thèse de doctorat. *Université de Constantine*. P 9-12-76.
- Trentham, D.E., A.S. Townes, A.H. Kang.(1997). Autoimmunity of type II collagen;An experimental model of arthritis. *J. Exp. Med*;146;857-868.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes C. J., Telser,J. (2004).Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.*Molecular and Cellular Biochemistry*;266(1-2):37-56.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic M., MazurM. (2006).Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.*Chemico-Biological Interactions*;160(1):1-40.
- Van, d.B.R., Haenen, G., Van, d.B.H., Van, d.V.W., Bast, A. (2000). The predictive value of antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry*. **70**: 391-395.
- Varthaman, A., Khallou-Laschet, J., Thauinat, O., et al. (2008). L'athérogenèse : une maladie dysimmunitaire. *Med Sci (Paris)*; **24** : 169-76
- Vaubourdolle, M. (2007). Infectiologie. 3 eme edition. Paris : Wolters Kluwer,p460
- Vaubourdolle, M. (2007).Infectiologie. 3^{eme} edition. Paris;Wolters Kluwer,
- Vencovsky, J. et al. (2003).Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*;62:427-430
- Vita, S., Zaja, F., Sacco, S., De Candia, A., Fanin, R., Ferraccioli, G. (2016). Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis; evidence for a pathogeneticrole of B cells. *Arthritis Rheum*:46;2029–2033.
- Von Hoff, D.D., Rozenzweig, M., Layard, M., et al. (1997). Daunomycin-induced cardiotoxicity in children and adults. A review of 110 cases. *Am J Med* ; **62** : 200-8.
- Vossenaar, E.R. et al.(2003).Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis.*Arthritis Rheum*;48:2489-2500

- Wagner, H., Wierer, M., Bauer, R. (2002). In vitro Hemmung der Prostaglandin- Biosynthese durch etherische Öle und phenolische Verbindungen. *Planta Medica*. 184-187
- Wardman, P., Candeias, L. P. (1996). Fenton chemistry; An introduction. *Radiation Research*;145(5):523-531.
- Weinmann, P. et al. (2007). Delayed neutrophil apoptosis in very early rheumatoid arthritis patients is abrogated by methotrexate therapy. *Clin Exp Rheumatol*, **25**, 885-887
- Weyand, C.M., Mac Carthy, T.G., Goronzy, J.J. (2015). Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*:95;2120–2126.
- Winter, C. A., Risley, E. A., Nuss, G. W.(1962).Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay of anti-inflammatory drug. *ProcSocExpBiolMed*;111:544–547
- Wolff, S.P. (1993). Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aethiology of diabetes mellitus. *Br Med Bull* ; 49 : 642-52.
- Yamanaka, H. et al.(2000).Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoidarthritis. *Arthritis Rheum*;43:852-858
- Yang, J., Guo, J., Yuan, J.(2008). *In vitro* antioxidant properties of rutin.*LWT - FoodScience and Technology*;41(6):pp. 1060-1066.
- Yanishlieva, N. VI., Marinova, E. M.(1995). Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerolsand methyl esters of fatty acids of sunflower oil.*Food Chemistry*;54 (4):pp. 337-382.
- Yoshihara, Y. et al. (2000).Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis.*Ann Rheum Dis*;59:455-461.
- Zaiter, L., Bouheroum, M., Benayache, S., Benayache, F., Leo'n, F., Brouard, I., Quintana, J., Este'vez, F., Bermejo, J. (2007). Sesquiterpene lactones and other constituents from *Matricaria chamomilla* L.. *Biochemical Systematics and Ecology*. **35**: 533-538.
- Zerargui, F., Boumerfeg, S., Charef, N., Baghiani, A., Djarmouni, M., Khennouf, S., Arrar, L., Musa H. Abu Zarga and Mohammad S. Mubarak. (2015). Antioxidant Potentials and Xanthine Oxidase Inhibitory Effect of Two Furanocoumarins Isolated from *Tamus communis* L. *Medicinal Chemistry*, **11**, 506-513



In vitro and in vivo anti-arthritic and anti-inflammatory activity of *Matricaria pubescens* (Desf.)

¹Ismail Bouden, ²Wissame Aimene, ³Rhoderick Elder, ¹Lakhmici Arrar

¹Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ferhat Abbas Setif 1, Setif 19000, Algeria.

²Molecular and Cellular biology laboratory, University of Brother Mentouri Constantine, Constantine 25017, Algeria.

³School of Environment and Life Sciences, University of Salford, 301a Cockcroft Building Salford, Greater Manchester M5 4WT, United Kingdom.

Address For Correspondence:

Ismail Bouden, Laboratory of Applied Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, University Ferhat Abbas Setif 1, Setif 19000, Algeria.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Received 12 September 2017; Accepted 28 November 2017; Available online 3 December 2017

ABSTRACT

Matricaria pubescens (Asteraceae) is a well-known medicinal plant used in the south-east of Algeria against several diseases. The main aim of the present study was to investigate the anti-inflammatory and anti-arthritic activity of the aqueous extract (AE), methanolic (ME) and acetone (AcE) of *Matricaria pubescens* (Mp). The inhibition of hypotonicity induced HRBC membrane lysis was taken as a measure of the anti-inflammatory activity. Protein denaturation was taken as a measure of the in vitro anti-arthritic activity. In vivo, collagen II induced arthritis in animal models was treated by AEMp with two different doses (100 mg/kg and 200 mg/kg). Arthritis assessment was done by measuring body weight and paw volume. Hematological parameters such as total white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), haemoglobin (Hb) and C-reactive protein (CRP) were measured on the last day of the study. The maximum membrane stabilization of AEMp was found to be 72.74% at a dose of 1500 µg/ml. The maximum percentage inhibition of protein denaturation for AEMp, MEMp and AcMp were found to be 63.08, 54.23 and 38.45 at a dose of 1500 µg/ml respectively. The dose AEMp (200 mg kg⁻¹) significantly reduced ($p < 0.01$) the arthritis-induced changes in body weight and paw edema. There was a significant reduction ($p < 0.01$) in the WBC and CRP in the treated groups. *Matricaria pubescens* extract significantly suppressed the physiological and biochemical changes occurred during collagen-induced arthritis in Wistar rats.

KEYWORDS: *Matricaria pubescens*, rheumatoid arthritis, collagen induced arthritis, antioxidant activity, antibacterial activity.

INTRODUCTION

Numerous physiological and biochemical processes in the human body may produce oxygen free radicals and other reactive oxygen species as byproducts. Overproduction of such free radicals can cause oxidative damage to biomolecules (lipids, proteins, DNA ...), eventually leading to many chronic diseases, such as atherosclerosis, cancer, diabetes, aging, and other degenerative diseases in humans [1, 2]. Plants may contain a wide variety of free radical scavenging molecules, such as phenolic compounds (e.g. phenolic acids, flavonoids, quinones, coumarins, lignans, stilbenes, tannins), nitrogen compounds (alkaloids, amines), vitamins, terpenoids (including carotenoids), and some other endogenous metabolites, which have important antioxidant activity [3]. The intake of natural antioxidants has been associated with reduced risks of cancer, cardiovascular disease, diabetes, and other diseases associated with ageing [4].

Inflammation is the reaction of living tissues to injury, infection or irritation. Lysosomal enzymes released during inflammation produce a variety of disorders which leads to the tissue injury by damaging the macromolecules and lipid peroxidation of membranes which are assumed to be responsible of certain

pathological conditions as heart attacks, septic shocks and rheumatoid arthritis. The extra-cellular activity of these enzymes is thought to be related to acute or chronic inflammation. Stabilization of lysosomal membrane is important in limiting the inflammatory response by inhibiting the release of lysosomal constituents of activated neutrophils such as bactericidal enzymes and proteases, which cause further tissue inflammation and damage upon extra-cellular release or by stabilizing the lysosomal membrane [5]. HRBC or erythrocyte membrane is analogous to the lysosomal membrane and its stabilization implies that the extract may also stabilize lysosomal membranes. Stabilization of human red blood cell membrane (HRBC) by hypotonicity induced membrane lysis can be taken as an *in vitro* measure of anti-inflammatory activity of the drugs or plant extracts.

Rheumatoid arthritis is a major ailment among rheumatic disorders. It is a chronic condition with multiple causations and affects the people in their most active period of life. The production of auto-antigens in certain arthritic diseases may be due to *in vivo* denaturation of proteins and the mechanism of denaturation probably involves alteration in electrostatic, hydrogen, hydrophobic and disulphide bonding [6]. So, by controlling the production of auto-antigens and inhibiting denaturation of proteins and membrane lysis in rheumatic disease leads to anti-arthritic activity. Hence, inhibition of protein denaturation and membrane lysis were taken as a measure of the *in vitro* anti-arthritic activity. A larger number of herbal extracts are in vogue for the treatment of various types of arthritis and inflammation.

Matricaria pubescens (Desf.) is a small annual plant, 10 to 20 cm high, rarely reaching 40 cm. with numerous prostrate stems that become erect. The thin dark green stems are only very slightly ramified. The deeply dissected leaves, with each lobe ending in a white tip, are slightly fleshy and are between 10 and 20 mm long. The tubular yellow flowers are grouped in hemispherical discoid heads. The flower heads are about 5 to 8 mm in diameter and are set at the ends of the stems. Flowering takes place in spring in the northern Algerian Sahara, and any time after rain in the central Algerian Sahara [7,8]. The whole plant is collected fresh in spring, and sold in the market in several oases in the south (Bechar, Djanet, El Golea). It is prepared as an infusion or powder and used internally. It has antiseptic properties. It is not reported as toxic by nomads. It is used for gastro-intestinal troubles and calculus, and is a much appreciated medicinal herb. The crushed stems and leaves are used as a filter for goat's butter, giving a nice aroma to the butter and helping to conserve it. It is also added to the traditional soup and gives the food a very nice smell.

MATERIAL AND METHODS

1. Plant material:

Matricaria pubescens was collected from Ouergla region, in February 2013. It was identified and authenticated by Pr. Zaafour, botanist at the Department of Biology, University of Annaba, Algeria. The parts of the plant (whole plant, flowers, and leaves) were dried in the dark at laboratory temperature.

2. Animals:

Male *Wistar* rats (130-150 g) were obtained from Animal House in University of Constantine. The rats were housed and maintained in standard conditions (22°C with constant humidity and a 12 h light/dark period). They were allowed *ad libitum* access to water and feed. All procedures involving rats were approved by the local authorities in conformity with Algerian Ministry of Agriculture ethical guidelines for the care and use of laboratory animals.

3. Preparation of extracts:

The aqueous extract of *M. pubescens* (AEMp) was prepared by boiling 10 g of plant powder in 200 ml of sterile distilled water for 30 min. The flasks were then plugged and removed from heat and allowed to cool. After cooling, the contents of flasks were filtered [9,10]. This was repeated and the filtrates were combined and concentrated in a rotary evaporator to obtain the crude extract [11].

For the Preparation of methanol and acetone extracts, 10 g of plant powder was submitted to extraction with methanol or acetone 70% (v/v) in distilled water [11]. The extraction under reflux was repeated three times every 2 hours. The extracts were filtered and concentrated in a rotary evaporator at 30°C then dried at room temperature to obtain the methanol extract (ME) and acetone extract (AcE) then stored at 4°C until use.

4. *In vitro* anti-inflammatory activity:

In vitro anti-inflammatory activity of different extracts of *Matricaria pubescens* was evaluated using red blood cells (RBC) membrane stabilization method [12]. Goat RBC was used for the study of membrane stability. Goat blood was collected and mixed with 3.8% trisodium citrate solution and centrifuged at 3000 rpm. After washing the packed cells in isosaline, 10% suspension was made. Reaction mixture (4.5 ml) was prepared with 0.5 ml of 10% RBC suspension, 1 ml of phosphate buffer (pH 7.4), 2 ml of hyposaline (0.25% NaCl) and 1 ml of tested solution of different concentrations (0.25, 0.5, 1 and 1.5 mg/ml) of extracts. The samples were then incubated at 37 °C for 30 min followed by centrifugation for 20 min at 3000 rpm. Supernatant was tested for

hemoglobin content at 560 nm using a UV-Visible spectrophotometer. The percentage of RBC membrane stabilization was calculated as follows: % Protection = $100 - [(A_{\text{sample}} / A_{\text{Control}}) \times 100]$

5. *In vitro* anti-arthritis activity:

In vitro anti-arthritis activity of AEMp, MEMp and AcMp were evaluated using bovine serum protein denaturation method [13].

Test solution (0.5 ml):

0.5% w/v aqueous solution of BSA (0.45 ml) and test solution (0.05 ml) of different concentrations were used.

Test control solution (0.5 ml):

0.5% w/v aqueous solution of BSA (0.45 ml) and distilled water (0.05 ml) were used.

Product control (0.5 ml):

0.45 ml distilled water and test solution (0.05 ml) of different concentrations were used.

Standard solution (0.5 ml):

0.5% w/v aqueous solution of BSA (0.45 ml) and diclofenac sodium (0.05 ml) of different concentrations were used.

A volume of 0.05 ml of Test solution or standard drug (sodium Diclofenac) of different concentrations (0.25, 0.5, 1 and 1.5 mg/ml) were mixed with 0.45 ml of 0.5% (w/v) BSA. The samples were incubated at 37 °C for 20 min followed by incubation at 57 °C for 3 min. Then 2.5 ml of phosphate buffer (pH 6.3) were added to each sample after cooling. UV-Visible spectrophotometer was used to measure the absorbance at 255 nm. The control represents 100% protein denaturation. The percentage inhibition of protein denaturation was calculated by the following formula:

$$\text{Percentage inhibition} = 100 - [(A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}) / A_{\text{control}}] \times 100.$$

In vivo anti-inflammatory and anti-arthritis activity:

6. Collagen-induced arthritis:

Collagen-Induced Arthritis (CIA) in rats was induced as previously described [14], with minor modifications [15]. Collagen was dissolved overnight at 4 °C in 0.1 M acetic acid then added drop wise to an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA). Approximately 3 mg/kg of type II collagen in CFA was intradermally administered 2 cm distal to the base of the tail for each rat [16]. In this study, rats were divided into 4 groups (n = 6) (A, B, C and D). Groups A received normal saline, while Groups C, D (the test groups) were orally administered 100 and 200 mg/kg of the AEMP, respectively.

These rats were orally administered with extracts once a day from day 0-45. Anti-arthritis activity of AEMP was evaluated by following parameters: paw volume, and body weight on days 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45. On day 46 the animals were anaesthetized with ether and the blood was obtained by retro-orbital puncture for the estimation of hematological parameters.

Measurement of paw volume:

The severity of arthritis was assessed by measuring changes in paw edema using a digital caliper (on day 0 before collagen type II injections and thereafter on days 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45). The change in paw volume was calculated as the difference between the final and initial paw volume. Percentage inhibition of paw edema with respect to untreated group (control) was calculated using the formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 \times (E_{\text{control}} - E_{\text{treated}}) / E_{\text{control}}$$

Where E_{control} and E_{treated} are the extent of edema from the arthritic control and treated group, respectively.

Evaluation of hematological and biochemical parameters:

On day 46 the rats were sacrificed, approximately 5 ml of blood samples were collected from hematological parameters like red blood cell (RBC) count, white blood cell (WBC) count, hemoglobin (Hb), Serum C-reactive protein (CRP) were determined by usual standardized laboratory method.

Statistical Analysis:

Results were analyzed using one way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparisons test by using GraphPad Prism; version 7.03. Values were expressed as mean \pm SEM and p values \leq 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

In-vitro Anti-Inflammatory Activity by HRBC Method:

The HRBC membrane stabilization has been used as a method to study the in vitro anti-inflammatory activity because the erythrocyte membrane is analogous to the lysosomal membrane [18, 19] and its stabilization implies that the extract may well stabilize lysosomal membranes. Stabilization of lysosomal is important in limiting the inflammatory response by preventing the release of lysosomal constituents of activated neutrophil, such as bacterial enzymes and proteases, which causes further tissue inflammation and damage upon extra cellular release. The lysosomal enzymes released during inflammation produce a various disorders. The extracellular activity of these enzymes are said to be related to acute or chronic inflammation. The non-steroidal drugs act either by inhibiting these lysosomal enzymes or by stabilizing the lysosomal membrane [20].

The extract was effective in inhibiting the heat induced hemolysis at different concentrations. The results showed that AEMp at concentration 1000 and 1500 µg/ml protect significantly ($p < 0.01$) the erythrocyte membrane against lysis induced by heat (Table 1). Diclofenac sodium 1500 µg/ml offered a significant ($p < 0.001$) protection against damaging effect of heat solution.

The results showed that AEMp at concentration range of 1000-1500 µg/ml protect significantly ($p < 0.01$) the erythrocyte membrane against lysis induced by hypotonic solution (Table 1). Diclofenac (1500 µg/ml) offered a significant ($p < 0.001$) protection against the damaging effect of hypotonic solution. At the concentration of 1500 µg/ml, EAMp, MEMp and AcMp showed maximum of 72.74 %, 60.43% and 41.58% protection respectively, whereas, Diclofenac sodium (1500 µg/ml) showed 90.07 % inhibition of RBC hemolysis when compared with control.

Table 1: Effect of AEMp, MEMp and AcMp on HRBC membrane hemolysis and membrane stabilization for anti-inflammatory activity. Data expressed as mean \pm SEM (n=3).

Extract	Concentration (µg/ml)	% Hemolysis	% Stabilization
Control	-	-	-
AEMp	250	69.63 \pm 1.27 ^{ns}	30.37 \pm 1.27 ^{ns}
	500	53.19 \pm 1.49 [*]	46.80 \pm 1.49 ^{**}
	1000	39.21 \pm 0.91 ^{**}	62.45 \pm 0.91 ^{**}
	1500	27.25 \pm 1.24 ^{**}	72.74 \pm 1.24 ^{**}
MEMp	250	78.25 \pm 0.88 ^{ns}	21.75 \pm 0.88 ^{ns}
	500	64.65 \pm 1.20 ^{ns}	35.35 \pm 1.20 ^{ns}
	1000	48.06 \pm 1.58 ^{**}	51.49 \pm 1.58 ^{**}
	1500	39.57 \pm 0.92 ^{**}	60.43 \pm 0.92 ^{**}
AcMp	250	89.20 \pm 1.56 ^{ns}	10.8 \pm 1.56 ^{ns}
	500	76.36 \pm 2.04 ^{ns}	23.64 \pm 2.04 ^{ns}
	1000	66.85 \pm 1.25 ^{ns}	33.15 \pm 1.25 ^{ns}
	1500	58.42 \pm 0.63 [*]	41.58 \pm 0.63 [*]
Diclofenac sodium	250	47.41 \pm 1.08 ^{**}	52.59 \pm 1.08 ^{**}
	500	35.19 \pm 1.89 ^{**}	64.80 \pm 1.89 ^{**}
	1000	15.55 \pm 1.13 ^{***}	82.45 \pm 1.13 ^{***}
	1500	09.92 \pm 0.98 ^{***}	90.07 \pm 0.98 ^{***}

In vitro anti-arthritis activity by bovine serum denaturation method:

Protein denaturation is a process in which proteins lose their tertiary structure and secondary structure by application of external stress or compound, such as strong acid or base, a concentrated inorganic salt, an organic solvent or heat. Most biological proteins lose their biological function when denatured. Denaturation of proteins is a well-documented cause of inflammation. As part of the investigation on the mechanism of the anti-inflammation activity, ability of plant extracts to inhibit protein denaturation was studied. It was effective in inhibiting heat induced albumin denaturation. Maximum inhibition of BSA denaturation by 63.08 was observed at 1500 µg/ml by AEMp, a standard anti-inflammation drug showed the maximum inhibition 74.40 % at the concentration of 1500 µg/ml compared with control (Table 2).

Table 2: Effect of AEMp, MEMp and AcMp on protein denaturation assay for antiarthritic activity. Data are expressed as means \pm SEM (n=3).

Extract	Concentration (µg/ml)	% Inhibition of denaturation
Control	-	-
AEMp	250	8.50 \pm 1.83 ^{ns}
	500	12.64 \pm 1.09 ^{ns}
	1000	41.74 \pm 1.76 [*]
	1500	63.08 \pm 0.87 ^{**}
MEMp	250	5.36 \pm 2.05 ^{ns}
	500	9.85 \pm 1.56 ^{ns}
	1000	32.45 \pm 0.63 ^{ns}
	1500	54.23 \pm 2.14 ^{**}
AcMp	250	2.54 \pm 1.85 ^{ns}
	500	6.35 \pm 0.76 ^{ns}

	1000	23.75 ± 1.55 ^{ns}
	1500	38.45 ± 2.30 ^{ns}
Diclofenac sodium	250	10.32 ± 0.70 ^{ns}
	500	16.15 ± 1.58 ^{ns}
	1000	45.57 ± 1.65 [*]
	1500	74.40 ± 2.21 ^{**}

In vivo anti-inflammatory and anti-arthritis activity:

Effect of AEMP on collagen induced arthritis paw edema:

The macroscopic sign of severe arthritis at 25th day included swelling, redness deformity and ankylosis in the hind paw and ankle joints (Figure 3). The symptoms of arthritic control rats showed significant difference ($p < 0.01$) as compared to the paw volume of healthy control rats. The arthritic rats treated with AEMP (100 mg kg⁻¹) no significantly the paw volume from day 0-45 onwards as compared to arthritic control group, the arthritic rats treated with AEMP (200 mg kg⁻¹) significantly ($p < 0.05$) lowered the paw volume from day 30 and 45 onwards as compared to arthritic control group (Figure. 4). The change in paw volume of AEMP treated (200 mg/kg; 4.30 ± 0.26 and 100 mg/kg; 4.97 ± 0.23 mm) was evident as compared to arthritic control (5.78 ± 0.20 mm) on day 45.

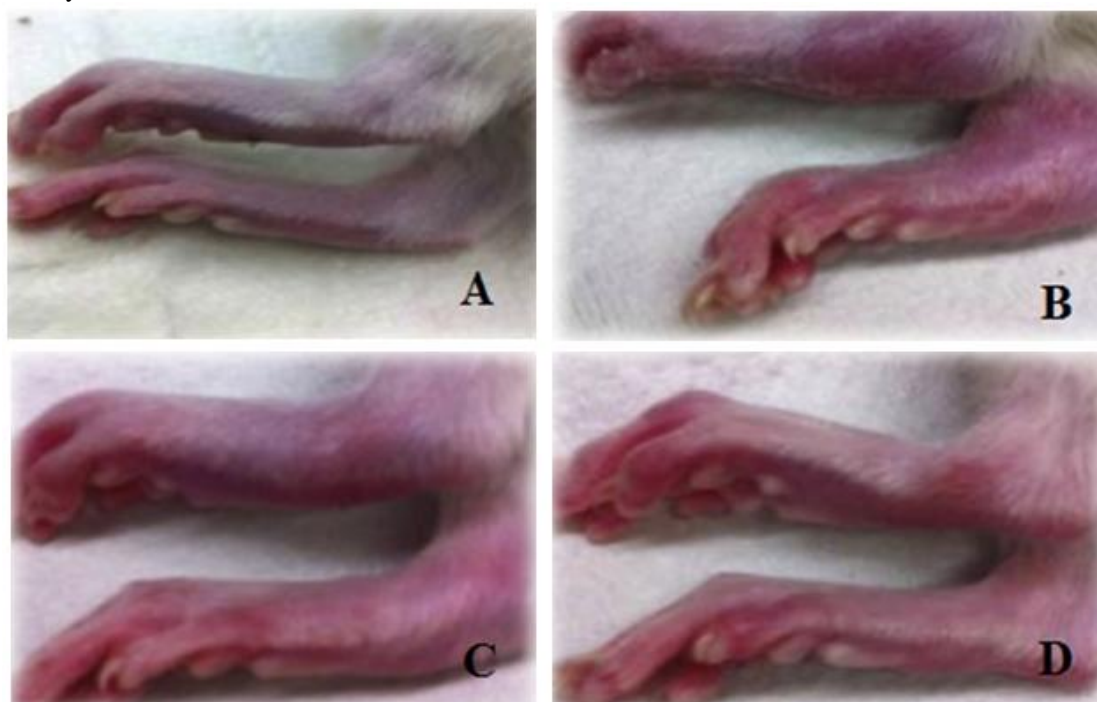


Fig. 3(A-D): Hind-limbs distal interphalangeal joints of representative rat groups (A) Normal rat, (B) Arthritis (C) *M. pubescens* treated 100 mg kg⁻¹ and (D) *M. pubescens* treated 200 mg kg⁻¹.

Effect of AEMP on body weight:

The challenge with collagen injected control rats significantly ($p < 0.01$) showed remarkable decrease in the body weight as compared to the healthy group on day 45 (Figure 5). The rats in the arthritic control group lost body weight as compared with the AEMP treated group. The body weight of treated group of AEMP (200 mg/kg; 145.0 ± 1.31 g and 100 mg/kg; 147.0 ± 1.75 g) was evident as compared to arthritic control group (142.3 ± 1.72 g) on day 45. The results indicate that AEMP (200 and 100 mg/kg) increased the body weight as compared to arthritic control group.

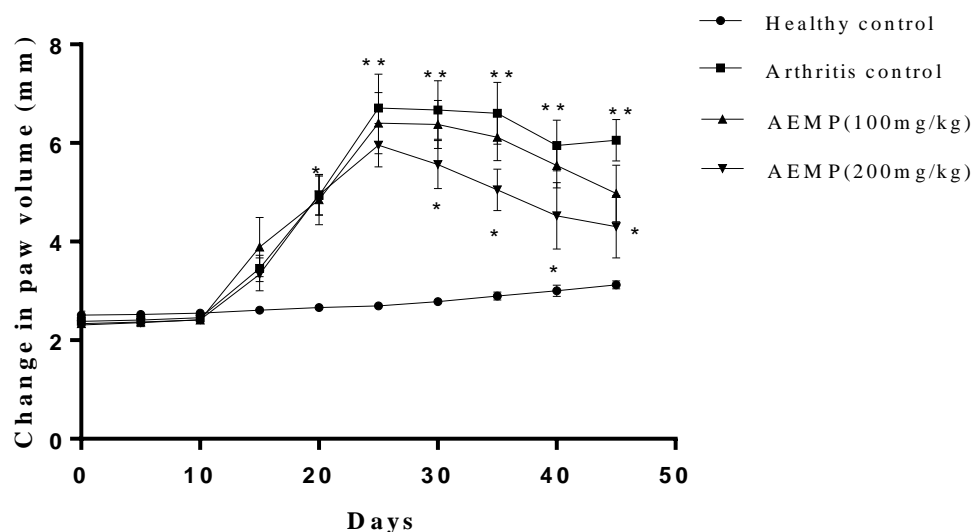


Fig. 4: Effect of AEMP on change in paw volume in Collagen-induced arthritis. Values are expressed as mean \pm SEM (n=6) and analysed by two-way ANOVA, * p <0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 when compared to arthritic control P < 0.001 when compared to healthy control.

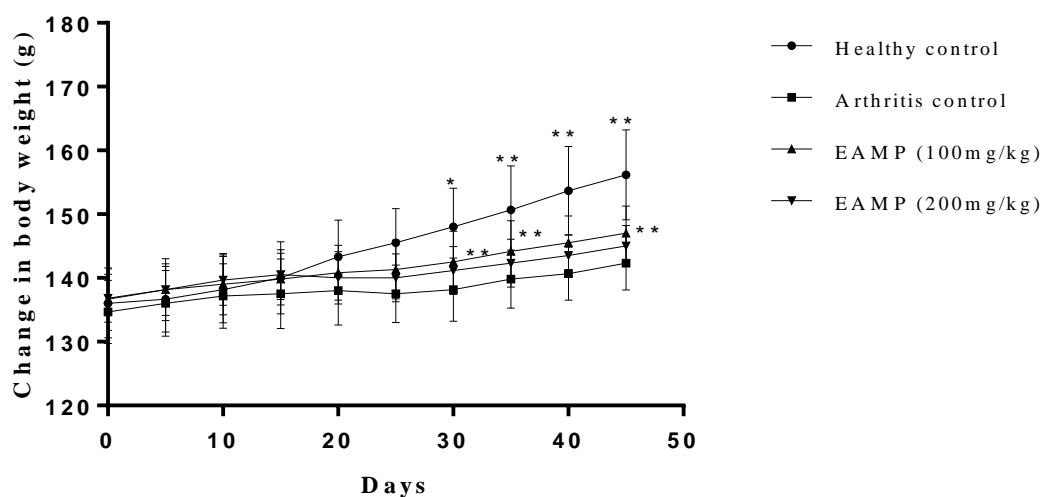


Fig. 5: Effect of AEMP on change in body weight in Collagen -induced arthritis. Values are expressed as mean \pm SEM (n=6) and analysed by two-way ANOVA, * p <0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 when compared to arthritic control p < 0.001 when compared to healthy control.

Effect of AEMP on hematological parameters:

There were significant differences (p < 0.001) in the total WBC, Hb and CRP analyzed between the arthritic controls and healthy control groups. The increased levels WBC and CRP, decreased levels of RBC and Hb were observed in arthritic control group. The Decreased level of serum CRP and WBC with treated group of AEMP (200mg/kg) were also significantly (p < 0.01), (Table 3).

Table 3: Effect of AEMP on hematological and serum parameters in collagen-induced arthritis in rats. Data expressed as mean \pm SEM (n=6).

Treatment groups	RBC (10^6 cells/mm ³)	WBC (10^3 cells/mm ³)	Hb (g/dL)	CRP (mg/lit)
Healthy control	6.31 \pm 0.25	6.78 \pm 0.23	14.24 \pm 0.24	1.42 \pm 0.16
Arthritis control	4.06 \pm 0.24*	14.98 \pm 0.40***	9.13 \pm 0.34***	7.29 \pm 0.34***
AEMP (100mg/kg)	4.20 \pm 0.31 ^{ns}	13.60 \pm 0.30 ^{ns}	10.36 \pm 0.36 ^{ns}	6.39 \pm 0.42 ^{ns}
AEMP (200mg/kg)	5.45 \pm 0.28*	9.96 \pm 0.40**	12.54 \pm 0.40**	3.77 \pm 0.22**

AEMP: Aqueous Extract of *Matricaria pubescens*; CIA: Collagen Induced

Arthritis; RBC: red blood cells; WBC: white blood cells; Hb: haemoglobin; CRP: C-reactive protein. Values are expressed as mean \pm SEM (n=6) * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 when compared to arthritic control # p < 0.001 when compared to healthy control.

The AEMP inhibited the paw edema by 60.63% in the arthritis treated by dose 200 mg/kg and inhibited by 37.23 % in the arthritis treated 100 mg/kg after 45 days (Figure6).

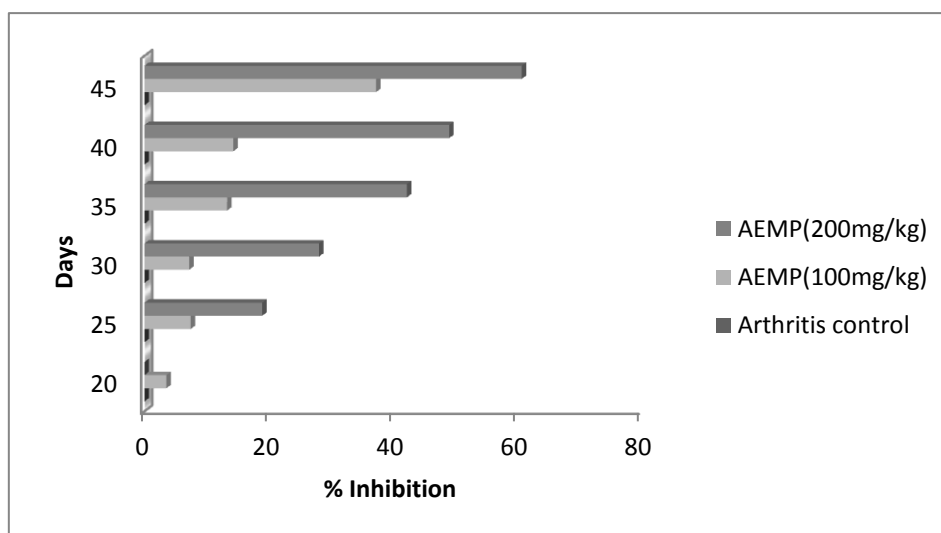


Fig. 6: Inhibition percentage of paw volume in collagen induced- arthritis in rats.

Discussion:

Literatures are now full of scientific documentation today regarding medicinal plants and they have potential to cure various human diseases [17]. Thus, this sub herb future further encourage to manufacture a pharmaceutical products procured from medicinal plants as they are safe and dependable as compare to synthetic drugs, that are not only costly but also have adverse effects [18]. The naturally isolated anti-arthritic agents function by suppressing the different types of inflammatory mediators involved in inflammation process [19]. So in this study two different methods in vitro and in vivo were adapted to evaluate the anti-arthritic property of *Matricaria pubescens* extract with this belief that the treatment of extracts releases various bioactive substances that could play a role in generating a particular pharmacological activity. Stabilization of lysosomal membrane is important in limiting the inflammatory response by inhibiting the release of lysosomal constituents of activated neutrophil. These neutrophil lysosomal constituents include bactericidal enzymes and protease, which upon extracellular release cause further tissue inflammation and damage. The erythrocyte membrane is analogous to the lysosomal membrane [20] and its stabilization implies that the extracts may as well stabilize lysosomal membrane. AEMP may possibly inhibit the release of lysosomal content of neutrophils at the site of inflammation.

Protein denaturation is one of well documented causes of inflammation in conditions like rheumatoid arthritis [21]. Production of auto-antigens in certain rheumatic diseases may be due to in vivo denaturation of proteins [22,23]. Some anti-inflammatory drugs have shown dose dependent ability to inhibit protein denaturation. Similar results were observed from many reports from plant extract [24]. Mechanism of denaturation probably involves alteration in electrostatic, hydrogen, hydrophobic and disulphide bonding. From the results of present study it can be stated that AEMP is capable of controlling the production of auto antigen and inhibits denaturation of protein in rheumatic disease.

Similarly protein denaturation method was done for this purpose. Protein denaturation is well documented method for this analysis also reflects the effect of extracts on cellular membrane like red blood cells. Since HRBC membrane are similar to lysosomal membrane components. The prevention of hypotoxicity induce HRBC membrane lysis is taken as a measure of anti-inflammatory activity of drugs. The aqueous extract of *Matricaria pubescens* caused significant anti-inflammatory activity at the concentration of 1500 µg/ml which is comparable to the standard drug diclofenac. The anti-inflammatory activity of the extracts was concentration the activity is also increased.

Denaturation of protein is one of the cause of rheumatoid arthritis was well documented. Production of auto antigen in certain arthritic disease may due to denaturation of protein. The mechanism of denaturation probably involves alteration I electrostatic hydrogen, hydrophobic and disulphide bonding. From the result of the present study, it can be stated that all the extracts of *Matricaria pubescens* capable of controlling the production of auto antigen and thereby it inhibit the denaturation of proteins and its effect was compared with the standard drug diclofenac sodium. The production of auto antigens in certain arthritic disease may be due to denaturation of protein and membrane lysis action. The maximum % inhibition of protein denaturation was observed as 63.08% at 1500 µg/ml.

Classical signs of severe arthritis were observed with intradermal type II collagen administration, including symmetrical joint involvement typically involving the hind paws, swelling, redness and erythema over the joints [25,15]. The hallmark symptoms of RA include fever, fatigue and weight loss [26]. The body weights of CIA rats gradually decreases following immunization and it will be at the lowest after three weeks of immunization [27,28]. Our study showed a significant loss in body weight around 45th days in the CIA rats as compared to the healthy control. Aqueous extract of *Matricariapubescens* (both doses) showed significant recovery in the body weight during the 45 days of treatment when compared to their arthritic controls.

Changes in body weight have also been used to assess the course of the disease and the response to therapy of anti-inflammatory drugs. As the incidence and severity of arthritis increased, the changes in the body weights of the rats also occurred during the course of the experimental period. The loss of the body weight during arthritic condition was also supported by earlier observations, on alterations in the metabolic activities of diseased rats. In arthritic condition, there is a mild to moderate rise in WBC count due to the release of IL-1B inflammatory response, IL-1B increases the production of both granulocyte and macrophages colony stimulating factors. In the present study, the migration of leucocytes into the inflamed is significantly suppressed by aqueous extract when compared to arthritis control, as seen from the significant reduction in the total WBC, RBC and Hbcount. This observation provides evidence to suggest the potential anti-inflammatory effect of *Matricariapubescens* against collagen-induced arthritis. The significant decline in symptoms of arthritis, paw thickness, and normalization of body weight and hematological parameters in *Matricariapubescens* treated arthritic rats postulates the possible anti-inflammatory effect of *Matricariapubescens* aqueous extract.

From the results of the study, it can be concluded extract of *Matricariapubescens* possessed antiarthritic property. However, one should try to further figure out extract more as having much better activity in quest of active candidate or chemical molecule that is mainly responsible for this activity via detailed experimentation.

Conclusion:

The present study showed significant anti-inflammatory and anti-arthritic activity of AEMp. In conclusion, these findings rationalize the traditional usage of this plant as an anti-inflammatory and anti-arthritic agent. The plant contains many secondary metabolites such as flavonoids, phytosterols, phenolics, etc. Hence proper isolation of the active principles might help in the findings of new lead compounds in the fields of anti-inflammatory and antiarthritic drug research. This established a significant scope to develop a broad spectrum use of *M. pubescens* in herbal medicine and as a base for the development of novel potent drugs against inflammations and arthritis.

REFERENCES

- [1] Seema, Chaitanya. Chippada1, Meena, Vangalapati, 2011. Antioxidant, an anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Centellaasiatica* extracts. *J. Chem. Bio. Phy. Sci.*, 1(2): Sec. B, 260-269.
- [2] Smolen, J., D. van der Heijde, E. St Clair, P. Emery, J. Bathon, E. Keystone et al., 2006. for the Active-Controlled Study of Patients Receiving Infliximab for the Treatment of Rheumatoid Arthritis of Early Onset (ASPIRE) Study Group Predictors of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis treated with highdose methotrexate with or without concomitant infliximab: results from the ASPIRE trial. *Arthritis Rheum.*, 54: 702-10.
- [3] Mythilypriya, R., P. Shanthi, P. Sachdanandam, 2008. Efficacy of siddha formulation Kalpaamruthaa in ameliorating joint destruction in rheumatoid arthritis in rats. *Chembiol interact.*, 176: 243-251.
- [4] Berbert, A.A., C.R.M. Kondo, C.L. Almendra, T. Matsuo, I. Dichi, 2005. Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. *Nutrition.*, 21: 131-6.
- [5] Nair, V., S. Singh, Y.K. Gupta, 2011. Evaluation of the disease modifying activity of *Colchicum luteum* Baker in experimental arthritis. *Jethnopharmacol.*, 133: 303-7.
- [6] Babuselvam, M., S. Ravikumar, K.A. Mohamed Farook, S. Abideen, M. Peer Mohamed, M. Uthiraselvam, 2012. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic effects on the extracts of different parts of *Excoecariaagalloycha* L. *J. Appl Pharma Sci.*, 2(9): 108-112.
- [7] Bounaga, N., Brac de la PRA., 1989. Plant genetic resources of the Sahara. *Ann.Inst. Nat. Agro. El Harrach*, 12(1): 79-94.
- [8] Ozenda, P., 2004. Flora and vegetation of the Sahara. Ed. CNRS, Paris. p: 662.
- [9] Sqalli, H., A. elouarti, A. ennabili, S. Ibsouda, A. Farah, A. Haggoud, A. Houari, M. Iraqui, 2007. Antimycobacterial evaluation of the effect of plants of North Central Morocco. *bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, (146): 271-288.
- [10] Loubaki, B.C., A.S. Outtara, C.A.T. Ouedraogo, A.S. Traore, 1999. Antimicrobial Activities of aqueous extracts of *Detariummicrocarpum* *Cesalpinaceae* on eight species of bacteria involved in infectious diseases

- at Burkina Faso. Science et Médecine, Rev. CAME-.01:67. Ozenda P, 2004. Flora and vegetation of the Sahara. Ed. CNRS, Paris. p.662
- [11] Kassi, Y., K. Aka, K.J.C. Abo, A. Méa, B.S. Néné, E.E. Ehilé, 2008. Anti-hypertensive effect of an aqueous extract of trunk bark of *ofparkiabiglobasa* (mimosaceae) on blood pressure of rabbit. *Sci. Nature.*, 5(2): 133-143.
- [12] Lavanya, R., S.U. Maheshwari, G. Harish, J.B. Raj, S. Kamali et al., 2010. Investigation of in vitro anti-inflammatory, anti-platelet and anti-arthritic activities in the leaves of *Anisomeles malabarica* Linn. *RJPBCS.*, 1: 745-752.
- [13] Rahman, H., M.C. Eswaraiyah, A.M. Dutta, 2015. In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa* var. joha rice (an aromatic indigenous rice of Assam). *American-Eurasian J Agric Environ Sci.*, 15: 115-121.
- [14] Gil-Hyun, Lee., Kyung-Yae, Hyun, 2015. Hydroponic-cultured Ginseng leaf extract attenuates murine collagen-induced arthritis by reducing pro-inflammatory responses. *IJISSET - International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology*, 2: 4.
- [15] Brand, D.D., K.A. Latham, E.F. Rosloniec, 2007. Collagen-induced arthritis. *Nat. Protoc.*, 2: 1269-1275.
- [16] Tudave, D., A. Radhakrishnan, S. Chakravathi, N. Haleagrahara, 2011. Modulation of C-re active protein and tumour necrosis factor- α in collagen-induced arthritis in dark Agouti rats: Impact of collagen concentration on severity of arthritis. *Inflamm. Res.*, 60: 897-907.
- [17] Lai, P.K., c.J. Rov, 2001. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Curr. Med. Chem.*, 47(2): 234-8.
- [18] Gordon, M.C., J.N. David, 2001. Natural product drug discovery in the next millennium. *Pharm. Biol.*, 39: 8-17.
- [19] Ekambaram, S., S.S. Perumal, V. Subramanian, 2010. Evaluation of antiarthritic activity of *Strychnos potatorum* Linn seeds in Freund's adjuvant induced arthritic rat model. *BMC Comp. Alt. Med.*, 10: 56.
- [20] Chou, C.T., 1997. The anti-inflammatory effect of *Tripterygium wilfordii* hookon adjuvant induced paw edema in rats and inflammatory mediators release. *Phytother Res.*, 11: 152-4.
- [21] Mizushima, Y., M. Kobayashi, 1998. Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with same biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.*, 20(1): 169-73.
- [22] Singh, M., P. Soni, N. Upmanyu, Y. Shivhare, 2011. In-vitro Anti-arthritic activity of *Manilkara zapota* Linn. *Asian J Pharm Tech.*, 1: 123-4.
- [23] Kokila, N., R. Radha, N. Jayshree, 2013. In vitro Antioxidant and antiarthritic activity of polyherbal formulation. *IJPI'S Journal of Pharmacognosy and Herbal Formulation.*, 13(3): 10-15.
- [24] Sakat, S., A.R. Juvekar, M.N. Gambhire, 2010. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *Int J Pharm Pharmacol Sci.*, 2(1): 146-55.
- [25] Asquith, D.L., A.M. Miller, I.B. McInnes, F.Y. Liew, 2009. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 39: 2040-2044.
- [26] Lee, D.M., M.E. Weinblatt, 2001. Rheumatoid arthritis. *Lancet.*, 358: 903-911.
- [27] Trentham, D.E., A.S. Townes, A.H. Kang, 1997. Autoimmunity of type II collagen: An experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.*, 146: 857-868.
- [28] Nagatomo, F., N. Gu, H. Fujino, T. Okiura, F. Morimatsu, I. Takeda, A. Ishihara, 2010. Effects of exposure to hyperbaric oxygen on oxidative stress in rats with type II collagen-induced arthritis. *Clin. Exp. Med.*, 10: 7-13.

ملخص

أظهرت الدراسة الفيتوكيميائية لنبته القرطوفة تواجد مخلف عناصر الميتابوليزم الثانوي في الجزء الهوائي للنبته مثل الفينولات المتعددة والتانينات والسابونوزيدات والكومارينات والجلوكوزيدات. كان معدل المركبات الفينولية محترم داخل المستخلصات القطبية. المستخلص الأسيون المائي احتوى أكبر معدل من حيث الفينولات المتعددة (129.12mg EAG/g) أما أكبر معدل للفلافونويدات سجل عند المستخلص الميثانولي (mg AC/g) (78.13) وأضعف معدل سجل عند المستخلص الأسيون.

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات بطريقتين اختبار DPPH و β -كاروتين حيث سجلنا نشاطا جدم مهم مضادا للجذور الحرة لهده النبته من خلال المستخلصات المدروسة بالمقارنة مع السلالات التي تنتمي الى نفس النوع في العالم.

بينت النتائج أن المستخلصات الخام لنبته القرطوفة تملك فعالية في اختزال معدل التوهالبر وتيني حيث سجل أكبر معدل تثبيط من خلال المستخلص المائي بنسبة 63.08% , وكذا القدرة على حماية الأغشية من التحلل حيث قدر معدل ثبات الأغشية ب 72.74% خلال الجرعة 1.5 مغ/مل.

بينت دراسة النشاط المضاد للالتهاب داخل الجسم أن حقن الكراجينين والكولاجين نمط 2 أدى زيادة معنوية في حجم الكف للفئران والجرذان. المعالجة عن طريق الحقن تحت الصفاق وعبر المسلك الفموي للمستخلص المائي (الجرعة 300مغ/كغ) أدى إلى تقليل من حجم الوذمة الحادة والمزمنة. كما سجل انخفاض معنوي في معدل الخلايا المناعية المسؤولة عن العمليات الالتهابية في الدم.

أظهرت تقنية الانتشار على الأقراص في الوسط الجيلوزي نشاط قوي للمستخلصات الخام للقرطوفة في تثبيط نمو البكتيريا

Staphylococcus aureus وكذا نشاط ضعيف ضد *Psoumonasa aeruginosa* و *E. coli*. بينت هذه الدراسة أهمية الاستعمال الواسع لنبته القرطوفة في الطب التقليدي حيث أنها فعلا تملك نشاطا مضادا للبكتيريا والأكسدة والالتهاب من خلال المستخلصات الخام المدروسة.

الكلمات المفتاحية: القرطوفة، التهاب المفاصل الرثوي، مضاد الأكسدة، مضاد البكتيريا، مضاد الالتهاب.

Résumé

L'étude phytochimique de la plante *Matricaria pubescence* a montré la présence de divers métabolites secondaires dans la partie aérienne de la plante tels que les polyphénols, les tanins, les saponosides, les terpènes, les coumarines et des glycosides. La teneur en composés phénoliques totaux (CPT) est plus importante dans les extraits polaires. L'acétone aqueuse renferme la teneur la plus élevée en polyphénols (129.12 mg EAG/g MS). Le taux maximal de flavonoïdes (78.13 mg ECa/g) est observé dans l'extrait méthanolique et le minimum (44.48 mg ECa/g) dans l'extrait acétone.

L'évaluation du potentiel antioxydant des extraits par deux méthodes: le test de DPPH et le test β -carotène, ont révélé une activité anti-radicalaire plus importante de cette plante au cours des extraits bruts testé par rapport aux autres espèces de ce genre dans le monde.

Les extraits bruts de *M. pubescens* présentent une capacité intéressante pour réduire le taux de la dénaturation des protéines, un maximum d'inhibition a été enregistré avec l'infusé avec une valeur de 63.08%. Ils présentent aussi une capacité de la protection de la lyse des membranes, un taux de protection de la membrane enregistré avec le même extrait avec 72.74% à la dose 1.5 mg/ml

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux du *Matricaria pubescens* présentent une efficacité sur l'œdème aiguë et chronique de la patte des souris induit par la carraghénine, et des rats induit par le collagène type II. Une diminution significative dans le taux des cellules immunitaires interviennent dans les processus inflammatoire.

La méthode de diffusion sur disques en milieu gélosé, a montré une forte activité des extraits bruts de la plante contre la croissance de *Staphylococcus aureus*, et une faible activité inhibitrice de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*; la partie aérienne étant la plus active.

En conclusion, l'étude a révélé que *Matricaria pubescence* plante largement utilisée en médecine traditionnelle, ont effectivement des pouvoirs antibactérienne, antioxydant et anti-inflammatoire.

Mots clés : *Matricaria pubescence*, polyarthrite rhumatoïde, antioxydant, antibactérien, anti inflammatoire.

Abstract

The phytochemical study of the plant *Matricaria pubescence* has shown the presence of various secondary metabolites in the aerial part of the plant such as polyphenols, tannins, saponosides, terpenes, coumarins and glycosides. The content of total phenolic compounds (CPT) is higher in the polar extracts. Aqueous acetone contains the highest content of polyphenols (129.12 mg EAG / g MS). The maximum level of flavonoids (78.13 mg ECa / g) is observed in the methanolic extract and the minimum (44.48 mg ECa / g) in the acetone extract. The evaluation of the antioxidant potential of the extracts by two methods: the DPPH test and the β -carotene test, revealed a greater anti-radical activity of this plant during the crude extracts tested compared with other species of this genus in the world. The crude extracts of *M. pubescens* have an interesting capacity to reduce the rate of denaturation of proteins, a maximum of inhibition was recorded with the infused with a value of 63.08%. They also have a membrane lysis protection capacity, a protection rate of the membrane recorded with the same extract with 72.74% at a dose of 1.5 mg / ml. The evaluation of the anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *Matricaria pubescens* is effective on acute and chronic edema of the mouse paw induced by carrageenan, and rats induced by collagen type II. A significant decrease in the level of immune cells is involved in inflammatory processes. The disk diffusion method in agar medium, showed a strong activity of the crude extracts of the plant against the growth of *Staphylococcus aureus*, and a weak inhibitory activity of the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*; the aerial part being the most active. In conclusion, the study revealed that *Matricaria pubescens* plant widely used in traditional medicine, actually have antibacterial, antioxidant and anti-inflammatory powers.

Keywords: *Matricaria pubescens*, rheumatoid arthritis, antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory.