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/**2020**

# Thèse

Présentée par

**BISSET Seghira**

Pour obtenir le diplôme de

**Doctorat en Sciences**

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Biochimie**

# Thème

# Etude de l'effet de la curcumine sur le stress oxydant et sur l'inflammation : Application à l'arthrite rhumatoide induite par le collgène II chez le rat

Soutenue publiquement le **13 / 10 / 2020**

**Devant le Jury**

| | | |
|---|---|---|
| Président : | **KHENCHOUCHE A/Halim** | **MCA. UFA Sétif 1** |
| Directeur: | **SOBHI Widad** | **MCA. UFA Sétif 1** |
| Examinateurs: | **KHETTAL Bachra** | **Pr. UAM Béjaia** |
| | **BEDJOU Fatiha** | **Pr. UAM Béjaia** |
| | **REZGUI A/Malek** | **MRA. CRBt Constantin** |

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

# *Remerciements*

En tout premier lieu, je remercie Dieu Le Tout Puissant pour m'avoir donné la force et le courage pour dépasser toutes les difficultés et atteindre ce niveau.

Un grand merci à Mme Widad SOBHI professeur à l'université Ferhat Abbas - Sétif, pour avoir accepté de poursuivre l'encadrement de mon travail et pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse dans de bonnes conditions. Merci également pour votre encouragement, les conseils dispensés, les expériences relatées et la confiance accordée durant ces années.

Je tiens à remercier Mr A/Halim KHENCHOUCHE pour avoir accepté de présider mon jury, Pr Bachra KHETTAL, Pr Fatiha BEDJOU et Dr Abdelamalek REZGUI pour avoir bien voulu examiner et juger mon travail.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Siham FERJIOUI et Yacine DERRAJI pour leur participation à ce travail.

Un immense merci à Mr Chawki BENSOUICI et à son équipe du laboratoire de Biochimie du CRBT pour son accueil au sein du laboratoire ainsi que pour l'aide qu'ils m'ont apporté au cours de mon stage.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé et soutenu, de près ou de loin, lors de la réalisation de cette thèse.

# Dédicace

*C'est avec l'aide et la Grâce de Dieu que j'ai achevé ce modeste travail.*

## À mes très chers parents

*Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte,*

*ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts, les sacrifices et les invocations que vous n'avez jamais cessé d'effectuer pour mon instruction et mon bien-être.*

## À mon mari

*Hassene, qui a patienté, m'a encouragé et soutenu pour m'offrir*

*les conditions propices à ma réussite.*

## À mes chères et adorables filles

*Maya et Marwa*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et réussite.*

## À mes frères, mes sœurs et mes belles-sœurs

## À tous les membres de ma famille petits et grands

# الملــخص

الهدف الرئيسي من هذا البحث هو تقييم تأثير الكركمين على الإجهاد التأكسدي والالتهاب في حالة الالتهاب المفصلي الروماتويدي المحرض بواسطة الكولاجين II عند الفئران .بداية تم تقييم التأثير المضاد للأكسدة في وسط خارج حيوي كمضاد أكسدة أولي (القدرة على التقاط الجذور الحرة و القدرة الارجاعية ) ، وكمضاد أكسدة ثانوي أو وقائي (القدرة على استخلاب الحديد) ، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الاختبارات أن الكركمين له قدرة عالية على التقاط وارجاع الجذور الحرة ، كما ان له تاثير فعال في استخلاب المعادن الانتقالية. من ناحية أخرى ، أظهر تقدير النشاط المضاد للالتهابات ومثبط نشاط ال XO في وسط خارج حيوي أن الكركمين مضاد جيد للالتهاب بقيمة $IC_{50}$ مساوية ل 1181.69 ± 1.11 ميكروغرام / مل ومثبط ممتازلانزيم XO مع بقيمة $IC_{50}$ مساوية ل 0.71 ± 0.06 ملغم / مل. تم تأكيد هذه النتائج عند الفئران في حالة الالتهاب المفصلي الروماتيدي المحرض بواسطة الكولاجين II ، و الذي تم خلاله تقييم التأثير الوقائي والعلاجي للكركمين (110 مغ / كغ) لمدة 40 يومًا ، حيث تم إثبات تأثير فعال ومهم من خلال انخفاض في العلامات السريرية المتعلقة بوزن الجسم ، وسمك باطن الارجل ، ودرجة التهاب المفاصل ، كذلك من خلال الحفاظ على الخصائص الدموية ، ومنع تخريب المفاصل المشخص بالتصويرالإشعاعي و الفحص المجهري للانسجة. من ناحية أخرى ، أظهر الكركمين تحسنًا في حالة علامات الإجهاد التأكسدي ( GSH، CAT، SOD، MDA) وحتى XO ، على مستوى الأنسجة. أخيرًا ، تشيرهذه النتائج إلى أن الكركمين يمكن أن يصنف كمضاد أكسدة ومضاد التهاب طبيعي جد فعال.



**الكلمات المفاتيح**: كركمين, مضاد اكسدة, إنزيم مؤكسد للكزانثين، تخريب الالبومين, التهاب المفاصل الروماتيدي.

## RESUME

Cette étude a pour but principal d'évaluer l'effet de la curcumine sur le stress oxydant et sur l'inflammation dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (PR) induite par le collagène-II chez les rats. Dans un premier temps l'effet antioxydant a été évalué *in vitro* en tant qu'un antioxydant primaire (effet scavenger des radicaux libres, et capacité réductrice), et en tant qu'un antioxydant secondaire ou préventif, (test de chélation de fer ferreux), les résultats obtenus par ces essais montrent que la curcumine possède une bonne activité scavenger des radicaux libres, et présente une activité chélatrice des métaux de transition efficace. D'autre part, l'estimation de l'activité anti-inflammatoire et l'activité inhibitrice vis-à-vis de la XO *in vitro*, montre que la curcumine est une bonne molécule anti-inflammatoire avec une valeur d'$IC_{50}$ de 1181,69 ± 1,11 µg / ml et excellent inhibiteur de la XO avec une $IC_{50}$ = 0,71 ± 0,06 mg / ml. Ces résultants ont été prouvés *in vivo*, dans le cas de la PR, induites chez des rats Wistars avec du collagène-II. Ces animaux ont été suivis pendant 40 jours. L'évaluation de l'effet préventif et curatif de la curcumine (110 mg/kg), a montré un effet efficace et considérable témoigné par une réduction des signes cliniques concernant : le poids corporel, l'épaisseur des pattes, le score arthritique, un maintien des paramètres hématologiques, et par une prévention des dommages articulaires estimés par le diagnostic radiologique et histopathologique. D'autre part, la curcumine a montré une amélioration de l'état des marqueurs du stress oxydatif (GSH, CAT, SOD, MDA) et même de la XO, au niveau tissulaire. Finalement, ces résultats indiquent que la curcumine peut être classer en tant qu'un bon anti-oxydant et anti-inflammatoire naturel indiqué pour soulager et prévenir les PR.



**Mots-clés**: Curcumine, anti-oxydant, XO, dénaturation d'albumine, polyarthrite rhumatoide.

## SUMMARY

The main aim of this research is to evaluate the effect of curcumin on oxidative stress and inflammation in the case of collagen-II induced rheumatoid athritis (RA) in rats. The antioxidant effect was initially assessed *in vitro* as a primary antioxidant (radical-scavenging and reducing abilities assays), and as a secondary or preventive antioxidant, (ferrous iron chelation assay), the results obtained from these assays showed that curcumin has a strong free radical scavenger activity and reducing abilities, and has an effective transition metal chelating activity. On the other hand, estimating of the anti-inflammatory activity and the inhibitory of XO activity *in vitro*, showed that curcumin is a good anti-inflammatory with an $IC_{50}$ value of 1181.69 ± 1.11 µg / ml and excellent XO inhibitor with an $IC_{50}$ = 0.71 ± 0.06 mg / ml. These findings were confermed *in vivo*, in the case of collagen-II induced RA in rats, accompanied by an assessment of the preventive and curative effect of curcumin (110 mg / kg) for 40 days, were demonstrated an effective and important effect evidenced by a reduction in clinical signs concerning: body weight, thickness of the legs, and arthritic score, by maintaining hematological parameters, and by preventing joint damage estimed by radiological or histopathological diagnosis. On the other hand, curcumin has showed an improvement in the state of the markers of oxidative stress (GSH, CAT, SOD, MDA) and even of XO, at the tissue level. Finally, these rasultats indicate that curcumin can calasse as a good natural antioxidant and anti-inflammatory.



**Key words**: Curcumin, anti-oxydant, XO, albumine denaturation, rhumatoid arthritis.

# LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| **$A_{0.5}$ :** | Concentration correspondant à une absorbance de 0.5 |
| **ACF :** | Adjuvant complet de Freund |
| **ACPA:** | Anti-citrullinated Protein Antibody |
| **AIF :** | Adjuvant incomplet de Freund |
| **AINS:** | Anti-inflammatoires non stéroïdiens |
| **Anti-CCP :** | Antipeptides cycliques citrullinés |
| **ASB:** | Albumine de serum bovin |
| **BAFF:** | B-cell activation factor |
| **CII:** | Collagène II |
| **CAT :** | Catalase |
| **CCl4 :** | Tétrachlorométhane |
| **CCP:** | protéine cyclique citrullinée |
| **CD :** | Cellules dendritiques |
| **CIA:** | Collagen induction arthritis |
| **CMH:** | Complexe d'histocompatibilité |
| **COX:** | Cyclo-oxygénase |
| **CPA:** | Cellules présentatrices d'antigène |
| **CRP:** | Protéine C-réactive |
| **CUPRAC:** | Cupric reducing antioxidant power |
| **$DL_{50}$:** | Dose létale |
| **DMARD:** | Disease modifying anti-rheumatic drugs |
| **EBV:** | Virus d'Epstein-Barr |
| **ERO :** | Espèces réactives de l'oxygène |
| **ERN:** | Espèces réactives de nitrogène |
| **EST:** | Encéphalopathies spongiformes transmissibles |
| **FAO:** | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| **FDA:** | Food and Drug Administration américaine |
| **FLS:** | Fibroblast like synoviocytes |
| **FR:** | Facteur rhumatoïde |
| **GOR:** | Galvinoxyl radical |
| **GSH:** | Glutathion |
| **G.R.A.S:** | Generally Recognized As Safe |
| **GPx:** | Glutathion peroxydase |
| **GSSG:** | Disulfure de glutathion |
| **HAS:** | Haute Autorité de Santé |
| **HLA:** | Human leukocyte antigen |
| **$IC_{50}$ :** | Concentration inhibitrice à 50% |
| **IFN-y :** | Interféront gamma |

| | |
|---|---|
| **IkB :** | inhibitor of NF-kB |
| **IL :** | Interleukin |
| **iNOS:** | Inducible nitric oxide synthase |
| **IUPAC:** | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| **JNK:** | c-Jun N-terminal kinases |
| **LTR:** | Long terminal repeats |
| **LOX:** | Lipoxygénase |
| **MAPK** | Mitogen- activated protein kinases |
| **MCP:** | Protéine chimioattractive des monocytes |
| **MCP :** | Métacarpophalangienne |
| **M-CSF:** | Macrophage colony stimulating factor |
| **MDA :** | Malondialdéhyde |
| **NF-kB:** | Nuclear factor-kappa B |
| **NTP:** | National toxicology program |
| **NOS :** | Nitric oxide synthase |
| **ODC :** | Ornithine décarboxylase |
| **OMS :** | Organisation mondiale de la santé |
| **OPG :** | Ostéoprotégérine |
| **PKC:** | Protéine kinase C |
| **PMN:** | Polymorphonucléaire neutrophiles |
| **PPAR-γ** | Proliferatoractivated- receptor-γ |
| **PR:** | polyarthrite rhumatoïde |
| **PTPN22:** | Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 |
| **RLs:** | Radicaux Libres |
| **RANK:** | Receptor activator of nuclear factor kappa-B |
| **RANK-L:** | Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand |
| **SLA:** | Sclérose latérale amyotrophique |
| **SOD :** | Superoxide Dismutase |
| **STAT:** | Signal transducers and activators of transcription |
| **TCR:** | T cell receptor |
| **TLR:** | Toll-like receptor |
| **Trx:** | Thioredoxin |
| **TNF :** | Tumor Necrosis Factor |
| **XDH :** | Xanthine Déshydrogénase |
| **XO :** | Xanthine Oxidase |

# LISTE DES FIGURES

**Figure 1.** Les quatre étapes de la réduction monoélectronique d'$O_2$ ..... 3

**Figure 2.** Sources cellulaires et interconversions des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN).7

**Figure 3.** Les principales sources cellulaires d'ERO et d'RNS et les corrélations entre les défenses antioxydantes ..... 11

**Figure 4.** Destruction articulaire dans la PR. ..... 14

**Figure 5.** Différentes déformations des doigts dans la PR. ..... 18

**Figure 6.** Représentation schématique des évènements cellulaires intervenant au cours de la polyarthrite rhumatoïde ..... 19

**Figure 7.** L'interaction du stress oxydant avec la polyarthrite rhumatoïde ..... 28

**Figure 8.** Régions de la curcumine 1. (A) b-dicétone ou céto-énol; (B) phénolique; (C) un lieur alcène ..... 31

**Figure 9**. Tautomérie céto-énolique de la curcumine dans différentes conditions physiologiques ..... 31

**Figure 10.** Activité anti-radicalaire de la Curcumine, le BHT et le BHA vis-à-vis le radical galvinoxyl (GOR). 52

**Figure 11.** $IC_{50}$ de la Curcumine, et des standards (BHT et BHT) vis-à-vis le radical galvinoxyl. ..... 52

**Figure 12.** Effet piégeur du radical $ABTS^{+\bullet}$ par la Curcumine, et les standards (BHT, et BHA). ..... 53

**Figure 13.** $IC_{50}$ d'effet piégeur du radical $ABTS^{+\bullet}$ par la Curcumine, le BHT et le BHA.. ..... 53

**Figure 14.** Effet piégeur du radical $OH^{\bullet}$ par la Curcumine et l'acide ascorbique . ..... 54

**Figure 15.** $IC_{50}$ d'effet piégeur du radical $OH^{\bullet}$ par la Curcumine et de l'acide ascorbique..... 54

**Figure 16.** Pouvoir réducteur de la Curcumine et des standards (Vit C, BHT et BHA). ..... 55

**Figure 17.** Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) de la Curcumine, le BHT, et le BHA .... 56

**Figure 18.** Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) représenté en $A_{0.5}$ par la Curcumine, le BHT et le BHA. ..... 56

**Figure 19.** Activité sur phenanthroline par la Curcumine, le BHT et le BHA.. ..... 57

**Figure 20.** Effet chélateur du fer ferreux de la Curcumine et du standard (EDTA). ..... 58

**Figure 21.** Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine induite par la chaleur par la Curcumine et la voltarène ..... 61

**Figure 22.** $IC_{50}$ d'effet anti-inflammatoire de la Curcumine et de la voltarène ..... 61

**Figure 23.** Pourcentage d'inhibition de la XO par la Curcumine et l'allopurinol..... 63

**Figure 24.** $IC_{50}$ de la Curcumine et de l'allopurinol vis-à-vis la XO. ..... 63

**Figure 25.** Les différents évolutions et scores cliniques de l'arthrite observés après 21 jours de l'induction de l'arthrite par le collagène type II pour les pattes antérieures (1) et les pattes postérieures (2) ..... 66

**Figure 26.** Effet préventif et curatif de la curcumine, et de l'indométacine sur les scores arthritiques chez des rats CIA. ..... 67

**Figure 27.** Effet préventif et curatif de la curcumine sur l'épaisseur des paumes et des plantes des pattes des rats CIA. ..... 69

**Figure 28.** Effet préventif et curatif de la curcumine sur le poids corporel chez des rats CIA. ..... 70

**Figure 29.** Radiographie des articulations des pattes antérieures et postérieures ..... 73

**Figure 30.** Score radiologique évalué pour les articulations bilatérales des pattes postérieures. ..... 74

**Figure 31.** Effet de la curcumine aux changements histopathologiques au niveau de l'articulation de la cheville des rats arthritiques colorés au H&E (x 40)……..…..75

**Figure 32.** Effet de la curcumine aux changements histopathologiques au niveau de l'articulation du poignet des rats arthritiques colorés au H&E (x 40)……..76

**Figure 33.** Score histologique évalué pour les articulations bélatirales de la cheville des pattes postérieurs……..77

# LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Les principales ERO/ ERN générées dans le système biologique ..... 4

**Tableau 2.** Le pouvoir réducteur représenté en $A_{0.5}$ de la Curcumine et des standards ..... 55

**Tableau 3.** $A_{0.5}$ de l'activité sur la O- phenanthroline de la Curcumine et des standards (BHT et BHA) ..... 57

**Tableau 4.** $IC_{50}$ de la chélation de fer ferreux de la Curcumine et du standard (EDTA)…….58

**Tableau 5**. Effet de la curcumine sur les paramètres hématologiques. ..... 71

**Tableau 6.** Effet de la Curcumine sur les marqueurs du stress oxydant au niveau de l'homogénat du foie ..... 79

**Tableau 7.** Effet de la Curcumine sur les marqueurs du stress oxydant au niveau de l'homogénat des reins. ..... 80

**Tableau 8.** Effet de la Curcumine sur l'activité de la XO dans des rats CIA. ..... 81

# SOMMAIRE

**Introduction** ..... **1**

**Synthèse Bibliographique** ..... **3**

**I. Radicaux libres et stress oxydant** ..... **3**

I.1. le stress oxydant ..... 3

I.2. Les radicaux libres ..... 3

I.2.1. Natures des radicaux libres dans l'organisme ..... 3

I.2.2. L'origine des radicaux libres ..... 4

I.3. Les systèmes antioxydants ..... 7

I.3.1. Les antioxydants enzymatiques ..... 7

I.3.2. Les antioxydants non enzymatiques ..... 9

I.3.2.1. Antioxydants éxogènes ..... 9

I.3.2.2. Antioxydants endogènes ..... 10

I.4. Stress oxydatif et dommages cellulaires ..... 11

I.4.1. Peroxydation lipidique ..... 12

I.4.2. Protéines ..... 12

I.4.3. Oxydation d'ADN ..... 13

**II. La polyarthrite rhumatoide (PR)** ..... **14**

II.1. Définition ..... 14

II.2. Epidémiologie ..... 15

II.3. Etiologie ..... 15

II.3.1. Fcteurs génétiques ..... 15

II.3.2. Facteurs hormonaux ..... 16

II.3.3. Fcteurs environnmentaux ..... 16

II.4. Aspects cliniques de la PR ..... 17

II.4.1. Les atteintes articulaires et tendineuses de la PR ..... 17

II.4.2. Les atteintes extra-articulaire de la PR ..... 18

II.5. Physiopathologie de la PR ..... 18

II.5.1. Phase d'initiation ..... 19

II.5.2. Phase de recrutement et d'inflammation de la synoviale ..... 20

II.5.3. Phase de destruction ..... 23
II.6. Diagnostique de la PR ..... 15
II.6.1. Signes cliniques ..... 15
II.6.2. Bilan biologique ..... 15
II.6.3. Bilan radiologique ..... 15
II.7. Stres oxydatif et PR ..... 15
II.7.1. Implication des ERO dans la pathologie de PR ..... 25
II.7.2. Roles pathogénèse des ERO dans la PR ..... 27
II.8. Therapeutique et stratégie d'inhibition de la PR ..... 28
II.8.1. Les corticostéroïdes ..... 28
II.8.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ..... 29
II.8.3. Les traitements de fond ..... 29
II.8.3.1. Les traitements de fond conventionnels (*synthetic* DMARD) ..... 29
II.8.3.2. Les biothérapies (*biologic* DMARD) ..... 29
**III. La curcumine ..... 30**
III.1. Histoire ..... 30
III.2. Structure ..... 30
III.3. Propriétés physico-chimiques ..... 32
III.3.1. Solubilité de la curcumine ..... 32
III.3.2. Spectre d'apsorbtion de la curcumine ..... 32
III.3.3. Stabilité de la curcumine ..... 33
III.4. Pharmacocinéitique et métabolisme ..... 33
III.5. Activité biologiques et propriétés pharmacologiques ..... 35
III.5.1. Effet anti-inflammatoire ..... 35
III.5.2. Effet antioxydant ..... 15
III.5.3. Effet anticancéreux ..... 36
III.5.4. Effet antimicrobien ..... 37
III.6. Toxicité de la curcumine ..... 37
**Matériel et Méthodes ..... 39**
**I. Matériel ..... 39**

I.1. Animaux ..... 39
I.2. Réactifs ..... 39
**II. Méthodes ..... 39**
II.1. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro* ..... 40
II.1.1. Effet scavenger du radical galvinoxyl (GOR) ..... 40
II.1.2. Réduction du radical cation $ABTS^{+\bullet}$ ..... 40
II.1.3. Effet piégeur du radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) ..... 41
II.1.4. Pouvoir réducteur ..... 41
II.1.5. Capacité antioxydante par réduction de cuivre ..... 42
II.1.6. Test de phenanthroline ..... 43
II.1.7. Chélation de fer ferreux ..... 43
II.2. Activité anti-inflammatoire *in vitro* ..... 43
II.3. Inhibition de la xanthine oxydase (XO) ..... 44
II.4. Effet de la curcumine sur l'arthrite rhumatoide induite par le collagène II (CIA) chez les rats ..... 44
II.4.1. Induction de l'arthrite rhumatoide ..... 44
II.4.2. Traitement préventif et curatif par la curcumine ..... 45
II.4.3. Evaluation des paramètres cliniques de l'arthrite ..... 45
II.4.4. Prélèvement du sang et des organes ..... 46
II.4.5. La numération formile sanguine ..... 46
II.4.6. Examen radiologique ..... 46
II.4.7. Examen histopathologique ..... 47
II.4.8. Préparation de l'homogénat ..... 47
II.4.9. Dosage des marqueurs du stress oxydant ..... 47
II.4.9.1. Dosage de malondialdéhyde (MDA) ..... 48
II.4.9.2. Dosage du glutathio réduit (GSH) ..... 48
II.4.9.3. Estimation de l'activité de la catalase (CAT) ..... 48
II.4.9.4. Estimation de l'activté de la superoxyde dismutase (SOD) ..... 49
II.4.9.5. Dosage des protéines totales ..... 49
II.4.10. Estimation de la xanthine oxydase ..... 50
II.5. Analyses statistiques ..... 50
**Résultats et Discussion ..... 51**

**I. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro* ..... 51**

I.1. Effet scavenger du radical galvinoxyl ..... 51

I.2. Réduction du radical-cation $ABTS^{+\bullet}$ ..... 52

I.3. Effet piégeur du radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) ..... 54

I.4. Pouvoir réducteur ..... 55

I.5. Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) ..... 56

II.6. Test de phenanthroline ..... 57

II.7. Chélation de fer ferreux ..... 57

**II. Activité anti-inflammatoire *in vitro* ..... 60**

**III. Inhibition de la Xanthine oxydase (XO) *in vitro* ..... 63**

**IV. Effet de la curcumine sur l'arthrite rhumatoide induite par le collagène II (CIA) chez les rats ..... 65**

IV.1. Evolution de l'arthrite rhumatoïde chez les rats induits au collagène-II ..... 65

IV.2. Effet préventif et curatif de la curcumine ..... 66

IV.2.1. Score arthritique ..... 67

IV.2. 2. Evolution du gonflement ..... 68

IV.2.3. Evolution du poids corporel ..... 70

IV.2.4. Paramètres hématologiques ..... 70

IV.2.5. Examen radiologique ..... 71

IV.2.6. Examen histopathologique ..... 74

IV.2.7. Potentiel antioxydant *in vivo* dans le cas de l'arthrite ..... 77

IV.2.7.1. Au niveau de l'homogénat du foie ..... 77

IV.2.7.2. Au niveau de l'homogénat des reins ..... 79

IV.2.8. Effet inhibiteur sur l'activité de la xanthine oxydase ..... 80

**Conclusion et perspectives ..... 92**

**Références bibliographiques ..... 94**

# *Introduction*

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la plus fréquente des diverses formes de rhumatismes inflammatoires chroniques regroupées sous l'appellation « arthrites chroniques ». Elle est classiquement intégrée dans le groupe des maladies auto-immunes qui constituent le troisième processus pathologique le plus fréquent après les maladies cardiovasculaires et le cancer (Somnath, 2016). Sa prévalence est entre 0,5 à 1% de la population mondiale (Alamanos *et al*., 2006) et elle est estimée à 0,15% en Algérie (Slimani, 2014). La PR est caractérisée par une inflammation symétrique de la membrane synoviale des articulaires appelés synovites (Burgos-Vargas et *al*, 2013). L'évolution de cette affection se fait par poussées inflammatoires, avec une aggravation progressive à l'origine de la destruction articulaire et d'un handicap fonctionnel en l'absence d'une prise en charge efficace (Paleolog, 2002).

Le stress oxydant, est fortement incriminé dans le développement de cette pathologie. Dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde, les espèces réactives d'oxygène (ERO) jouent un rôle clé dans l'inflammation chronique. En effet, le début du processus de phagocytose par les polynucléaires neutrophiles (PMN), qui représentent plus de 90% des cellules du liquide synovial pendant la polyarthrite rhumatoïde, nécessite une augmentation de consommation d'oxygène avec pour conséquence directe la production de quantité importantes des ERO (anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$), peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$)…) (Dewar et Harth, 1994), outre les PMN, l'augmentation de l'activité et des concentrations de la xanthine oxydase (XO) dans la membrane synoviale des patients atteints de la PR, est peut également participer dans la production accrue des ERO (Hanachi et *al*., 2009), qui sont capables de déstabiliser la membrane synoviale favorisant la destruction articulaire. Ce processus peut conduire à une diminution significative des systèmes de défense anti-oxydants, y compris le glutathion réduit (GSH), la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD) ou une augmentation significative des produits de dégradation que les radicaux libres causent comme le malondialdéhyde (MDA) (peroxydation des lipides) (Bonnefont-Rousselot et *al*., 2004).

En effet, les traitements actuels de l'arthrite sont inefficaces et produisent des effets secondaires importants et ont tendance à être onéreux. Les produits naturels semblent offrir de nouvelles et réelles possibilités de traitement.

Le curcuma a été utilisé dans le sud de l'Asie au IVe siècle avant J.-C. De nos jours, les scientifiques lui ont découvert pas moins de 600 applications préventives et thérapeutiques,

surtout vis-à-vis des processus inflammatoires. Les effets du curcuma sont dus à ses principes actifs, les curcuminoïdes, dont le principal est la curcumine.

L'objectif de la présente étude est d'estimer l'effet de la curcumine sur le stress oxydant et l'inflammation dans le cas de l'arthrite rhumatoïde induite chez les rats. L'étude *in vivo* a été précédée par une évaluation préliminaire de la curcumine, *in vitro,* de l'effet anti-oxydant, anti-inflammatoire et inhibiteur de la XO, après quoi nous avons procédé à l'étude *in vivo* sur des rats atteints d'une arthritique expérimentale induite par le collagène II (CIA). L'effet contre l'arthrite inflammatoire a été estimé par le suivi des signes cliniques de l'arthrite, des paramètres hématologiques, et par des études radiologiques et histologiques des articulations, tandis que l'effet sur le stress oxydant dans ces circonstances pathologiques a été évalué par le dosage des marqueurs du stress oxydant et même de l'activité de la xanthine oxydase au niveau tissulaire.

# *Synthèse Bibliographique*

# I. Radicaux libres et stress oxydant

## I.1. Le Stress oxydant

Dans les circonstances normales, l'organisme produit en permanence, et en faibles quantités des radicaux libres (prooxydants). Ces molécules sont utiles à doses physiologiques comme des médiateurs tissulaires, ou comme des résidus des réactions cellulaires énergétiques ou de défense (Yan, 2014). Elles joueraient un rôle dans certaines voies de signalisation, en activant notamment la voie NF-$\kappa$B (Lushchak, 2014). Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense antioxydants (Pincemail *et al*., 2000). Dans ces circonstances normales, la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction de radicaux, dont les origines sont exogènes ou endogènes, l'excès est appelé « stress oxydant » avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (Favier, 2003).

## I.2. Les radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique. Il s'agit d'un atome ou d'une molécule qui contient un ou plusieurs électrons non appariés, comme conséquence de la perte d'un ou plusieurs électrons de l'orbite externe, ce qui les rend fortement instables et plus réactifs, que l'atome ou la molécule dont il (elle) est issu(e) (Halliwell *et al*., 1999 ; Koechlin-Ramonatxo *et al*., 2006). Du fait de leur instabilité, les RLs ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant un à une autre molécule. Les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules et possédent un temps de demi-vie extrêmement court (de l'odredre de nano- à milliseconde) (Asmus et Bonifacic, 2000).

### I.2.1.Nature des radicaux libres dans l'organisme

Le dioxygène ($O_2$) est un élément essentiel à la survie des organismes aérobies car il intervient durant la phosphorylation oxydative, qui aboutit à la formation de l'énergie. Le dioxygène intervient à la fin de ce processus en tant qu'accepteur final d'électrons (Figure 1).

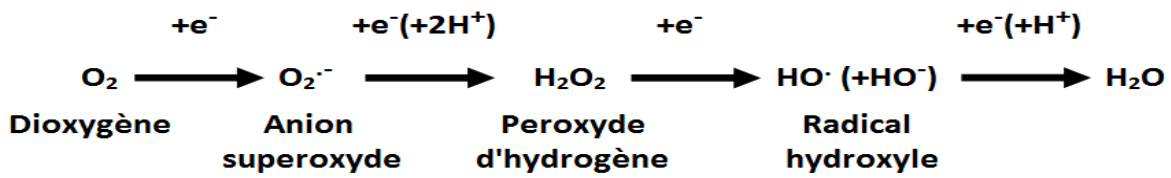



**Figure 1 :** Les quatre étapes de la réduction monoélectronique d'$O_2$ (Favier, 2003).

Ainsi, la réduction monoélectronique du dioxygène en eau se fait en quatre étapes pendant lesquelles des métabolites partiellement réduits du dioxygène sont générés. Ces métabolites présentent la particularité d'être plus réactifs que le dioxygène, ils sont des dérivés radicalaires (RLs), non radicalaires, ou même des précurseurs des RLs. L'ensemble est couramment appelés espèces réactives de l'oxygène (EROs) (Tableau 1), dont les principales sont l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et les radicaux hydroxyles (Rochette *et al*.,2008 ; Lushchak, 2014). Les espèces qui contiennent de l'azote à leur structure sont appelées espèces réactives du nitrogène (ERNs), la réactivité des formes radicalaires est généralement plus que les formes non radicalaires, du fait que les RLs sont moins stables (Sen *et al*., 2010).

**Tableau 1** : Les principales ERO/ ERN générées dans le système biologique (Phaniendra *et al*., 2015).

| **Espèces radicalaires** | | **Espèces non radicalaires** | |
|---|---|---|---|
| **Nom** | **Symbole** | **Nom** | **Symbole** |
| Anion superoxyde | $O_2^{\cdot-}$ | Oxygène singulet | $^1O_2$ |
| Monoxyde d'azote | $NO^{\cdot}$ | Peroxyde d'hydrogène | $H_2O_2$ |
| Radical alkoxyle | $RO^{\cdot}$ | Peroxyde organique | ROOH |
| Radical hydroxyle | $OH^{\cdot}$ | Peroxynitrite | $ONOO^-$ |
| Radical peroxyle | $ROO^{\cdot}$ | Acide hypochlorique | HOCL |

### I.2.2. L'origine des radicaux libres

La principale source de la production des ERO dans la cellule et dans l'organisme est la mitochondrie (chaine respiratoire) (Berger *et al*., 2006, Valko *et al*., 2006). Environ 2 % de l'oxygène utilisé par cet organite subit une réduction monoélectronique (Réaction 1) conduisant à la formation d'$O_2^{\cdot-}$, précursseur des ERO (Barja *et al*., 2004 ; Bonnefont-Rousselot *et al*., 2007).

$$O_2 + 1é \longrightarrow O_2^{\cdot-} \qquad (1)$$

Au cours de la flambée respiratoire une grande quantité d'$O_2^{\cdot-}$ est produite par la NADPH oxydase (Réaction 2) au niveau des cellules phagocytaires (polynucléaires et macrophages) activés, pour la lutte anti-infectieuse (Favier, 2003 ; Droge, 2002) et contre les cellules tumorales (Floyd, 1990). L'altération de ce système à ce niveau là conduit à l'apparition d'une maladie appelée "granulomatose chronique", les patients dans cette condition sont

extrêmement sensibles aux affections et meurent habituellement à un âge jeune (Defeng *et al*., 2003).

$$NADPH + 2O_2 \xrightarrow{\text{NADPH oxydase}} NADP^+ + H^+ + 2O_2^{\bullet -} \qquad (2)$$

De même une quantité d'$O_2^{\bullet -}$ est produite par la NADH déshydrogénase située dans la membrane mitochondriale interne (Huet *et al*., 2008), et la NADPH oxydase de cellules vasculaires endothéliales (Beaudeux *et al*., 2006).

La xanthine-déshydrogénase (XDH) est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP. Au décours des phénomènes d'ischémie-reperfusion, cette enzyme est modifiée en forme productrice des ERO, la xanthine-oxydase (XO) (Sultatos, 1988 ; Kanter, 1998). Dans le cas de l'ischémie, la grande consommation de l'ATP conduit à une accumulation d'hypoxanthine et de xanthine et donc une production des ERO plus importante par la XO, celle-ci, catalyse la réaction d'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique selon la réaction 3. Dans les deux étapes, l'oxygène moléculaire est réduit, formant l'anion superoxide (O'Mahony *et al*., 2013).

$$Xanthine + 2O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Xanthine oxydase}} Acide\ urique + 2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \qquad (3)$$

Par ailleurs, l'apparition de l'anion $O_2^{\bullet -}$ peut résulter de l'auto-oxydation (oxydation par oxygène) de certains composés tels que des neuromédiateurs (adrénaline, noradrénaline, dopamine (Droge, 2002 ; Berger *et al*., 2006), des thiols (cystéine), des coenzymes réduits ($FMNH_2$, $FADH_2$) (Favier, 2003), mais aussi de la détoxication des xénobiotiques (toxiques, médicaments) par le système des cytochromes P450, principalement dans le fois, présents au niveau du réticulum endoplasmique (Defeng *et al*., 2003 ; Barouki, 2006) et de l'acidose (Groussard, 2006).

L'anion $O_2^{\bullet -}$ formé est peu réactif car il n'est pas capable de traverser les membranes, il est éliminé rapidement ou diminue par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (Réaction 4), pour donner une autre espèce oxygénée, le peroxyde d'hydrogène (Thannickal et Fanburg, 2000).

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2 \qquad (4)$$

Le $H_2O_2$ peut être aussi formé par la réduction bioélectronique de l'oxygène en présence d'oxydases (aminoacides oxydase, glycolate oxydase…..) (Bonnefont-Rousselot *et al*.,

2007), qui se trouvent principalement dans des organites cellulaires comme les peroxysomes, et peuvent se produire ainsi de la désamination oxydative de certains amines par les monoamines oxydases présentes au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Gardès-Albert *et al*., 2003).

Le $H_2O_2$, n'est pas lui même radicale (Valko *et al*., 2006), la majeure partie de la toxicité de $H_2O_2$ provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $OH^{\cdot}$ (l'espèce oxygénée la plus réactive) (Sen *et al*., 2010) en présence de métaux de transition tels que $Fe^{2+}$ par la réaction de Fenton (Réaction 5) (Markesbery et Carney, 1999) ou même de $Cu^{2+}$ (Defeng *et al*., 2003) ou en présence de $O_2^{\bullet -}$, par la réaction d'Haber et Weiss ( Réaction 6), le radical $OH^{\cdot}$ est capable de s'attaquer sans spécificité aux macromolécules biologiques dès lors qu'il est formé (Phaniendra *et al*., 2015).

$$\mathbf{Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + {}^{\cdot}OH + OH^{-}} \quad (5)$$

$$\mathbf{O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + {}^{\cdot}OH + OH^{-}} \quad (6)$$

Par ailleurs, chez les neutrophiles activés, la myéloperoxydase, transforme le $H_2O_2$ en présence des ions de chlorure ($Cl^{-}$), en composé oxydant, l'acide hypochloreux (HOCL) (Figure 2). Ce dernier intervient dans la défense immunitaire en détruisant l'ADN des bactéries, ce qui permet d'inhiber leur réplication (Rosen *et al*., 1998).

Le radical monoxyde d'azote ($NO^{\cdot}$), est essentiellement produit par NO synthase (NOS) qui convertit la L-arginine en NO et L-citrulline (Réaction 7) (Ghafourifar, 2005 ; Berger *et al*., 2006) à des fins de médiateurs dans les neurones, les cellules endothéliales, ou les macrophages (Favier, 2003).

$$\mathbf{O_2 + L\text{-}Argénine + NADPH \xrightarrow{Nitrique\ oxyde\ synthase} NO^{\cdot} + L\text{-}citrulline + H_2O + NADP^{+}} \quad (7)$$

Le découplage de NOS endothéliale (NOSe), à l'origine d'un transport d'électrons sur l'oxygène et non sur la L-arginine. Il en résulte la formation de $O_2^{\bullet -}$ délétère, à la place de $NO^{\cdot}$ protecteur (Hyaden *et al*., 2003).

Rappelons que la production concomitante dans un même lieu de $NO^{\bullet}$ et $O_2^{\bullet -}$ s'avère très dommageable en donne rapidement naissance à une espèce radicalaire hautement réactif, le peroxynitrite ($ONOO^{-}$) (Beckman, 2001 ; Henrotin *et al*., 2005) qui peut donner à son tour le radical $OH^{\cdot}$ (Favier, 2003) (Figure 2). La surproduction des ERN est connue par le nom « stress nitrosatif » (Klatt et Lamas, 2000).

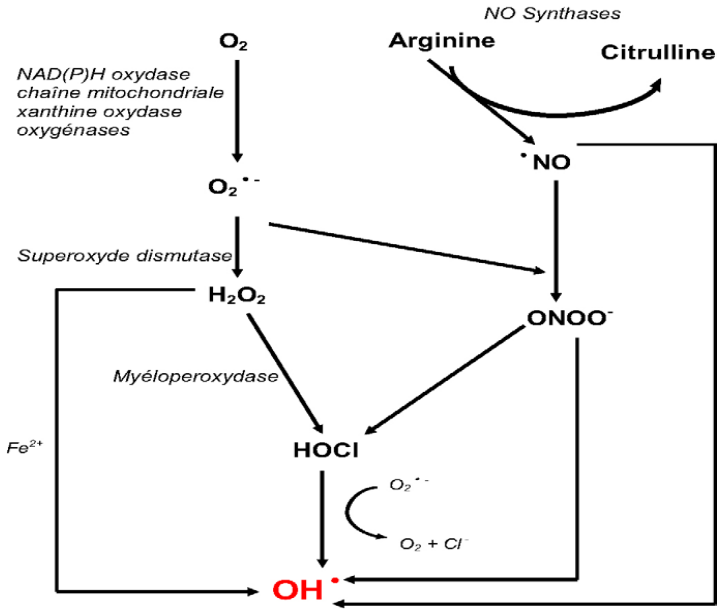



**Figure 2** : Sources cellulaires et interconversions des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) (Beaudeux *et al*., 2006).

En plus de ces sources endogènes, il existe différentes sources exogènes qui sont majoritairement des pro-oxydants environnementaux et qui favorisent la production des ERO, tels que la pollution de l'air et de l'eau, le rayonnement ultraviolet (UV), l'alcool, type de cuisson (viande fumée, huile usagée, graisse…), les médicaments (tels que Halothène, Paracétamol, Bleomycine, Doxorubicine, Metrenidazole, Ethanol) , le CCl4, la fumée de tabac, les métaux de transition (Cd, Hg, Pb), les métaux lourds (Fe, Cu, Co, Cr), solvants industriels, pesticides, haute température (Phaniendra *et al*., 2015).

### I.3. Systèmes Antioxydants

En situation physiologique, l'organisme est capable de maintenir une production constante, mais modérée, d'ERO/ERN, et celle-ci est assurée par la disposition d'un système dit antioxydant (Defeng *et al*., 2003). Il existe Une large gamme de substances qui possèdent cette propriété qui peuvent être divisés en antioxydants enzymatiques aux propriétés catalytiques spécifiques et en antioxydants non enzymatiques. Certains sont produits par l'organisme, appélés les antioxydants endogènes, ou proviennent de l'alimentation. Ils sont donc exogènes (Berger *et al*., 2006).

#### I.3.1. Antioxydants enzymatiques

La régulation endogène des ERO est principalement effectuée par le système enzymatique qui peut neutraliser directement les EROs. Ce système de défense est composé

principalement du superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), et glutathion peroxydases (GPx).

- **Le superoxyde dismutase (SOD)**

La SOD, représente la première ligne de défense contre les ERO (Sen *et al*., 2010). C'est une métalloprotéine, qui se trouve principalement sous trois isoformes : forme cytosolique et nucléaire Cu/Zn-SOD (SOD1), forme mitochondriale Mn-SOD (SOD2), et une forme extracellulaire EC-SOD (SOD3) (Valko *et al*., 2006). Les différentes SOD catalysent la dismutation rapide de l'anion $O_2^{\cdot-}$ en $H_2O_2$ et $O_2$ (Réaction 4) (Afonso *et al*., 2007).

Il semblerait que la MnSOD soit très importante pour la survie. Il a été démontré que des souris, dont le gène codant la MnSOD est invalidé (Knock Out), ne survivent que 10 à 18 jours en moyenne et présentent de nombreuses pathologies telles que des cardiomyopathies ou une dégénérescence des neurones (Indo *et al*., 2015).

- **La catalase (CAT)**

la CAT est une enzyme qui favorise très efficacement la transformation du $H_2O_2$ en $H_2O$ et $O_2$ (Réaction 8) (Valko *et al*., 2006) et est localisée dans le peroxysome (Defeng *et al*., 2003). La catalase est particulièrement présente dans les érythrocytes, le foie et parfois les reins plus particulièrement au niveau des peroxysomes (Kodydková *et al*., 2014).

$$\mathbf{2H_2O_2} \xrightarrow{\mathbf{CAT}} \mathbf{2H_2O + O_2} \qquad (8)$$

La catalase joue un rôle important dans la dismutation de fortes concentrations d'$H_2O_2$, par rapport à la GPx qui permet la dégradation de faibles concentrations d'$H_2O_2$ (Halliwell B, Gutteridge, 2007).

- **Le Glutathion peroxydase (GPx)**

Les glutathions peroxydase GPx sont des sélénoenzymes. Il existe cinq isoformes de la glutathion peroxydase chez les mammifères, localisées dans la mitochondrie, le noyau ou le cytoplasme (Ding *et al*., 1998). Ils transforment le $H_2O_2$ en $H_2O$ lors d'une réaction couplée à l'oxydation du glutathion (GSH) (Réaction 9). Le glutathion oxydé est non toxique et peut en outre être réduit par le NADPH grâce à l'enzyme glutathion réductase (GR) (Sen *et al*., 2010 ; Droge, 2002).

$$\mathbf{2GSH + H_2O_2} \xrightarrow{\mathbf{GPx}} \mathbf{GSSG + {}_2H_2O} \qquad (9)$$

Outre le peroxyde d'hydrogène, les GPx peuvent éliminer de nombreux peroxydes tels que les hydroperoxydes (ROOH) qui proviennent de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Afonso *et al*., 2007).

En plus des trois enzymes citées précédemment, Il existe de nombreuses autres enzymes antioxydantes comme: les peroxyredoxines, l'hème oxygénase, les glutathion transférase, les thioredoxine réductase ou les thioredoxine peroxydase (Favier, 2003).

### I.3.2. Antioxydants non enzymatiques

Les cellules utilisent de nombreuses molécules antioxydantes non enzymatiques de source endogène ou exogène, de différentes structures et interagissent à de différents niveaux (Sen *et al*., 2010).

#### I.3.2.1. Antioxydants exogènes

Certains composés antioxydants sont apportés par les aliments dont les plus importants :

- **Les vitamines :** Elles piégent les radicaux en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ion stable (Favier, 2003). La vitamine devient ainsi un radical moins réactif que les radicaux (Bahorun *et al*., 2006), puis elle sera soit détruite soit régénérée par un autre système, comme le cas de la vit E, qui a surtout un effet protecteur vis-à-vis la peroxydation lipidique. Néanmoins, au niveau de la membrane cellulaire (Bjorneboe *et al.* 1990, Pryor, 2000) la vit E est régénérée par la vit C, qui elle même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases (Figure 3) (Favier, 2003).
- **Les oligo-éléments** ; comme le Sélénium (Se), cuivre (Cu), zinc (Zn), manganèse (Mn), sont de métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant et agissent indirectement comme antioxydant car ils sont indispensables à la fonction des enzymes antioxydantes (Pincemail *et al*., 1999, Berger, 1997).
- **Les caroténoïdes**, une des plus anciennes fonctions connues des caroténoïdes, pigments de beaucoup de fruits et de légumes rouges et oranges, est leur action en tant que provitamines A. Les deux groupes majeurs de caroténoïdes (lutéine, zéaxanthine, cryptoxanthine) porteurs de substitutions oxygénées, et ceux qui sont comme l'alpha, le béta carotène et le lycopène non oxygénés, sont de très puissants agents anti-radicalaires. Leur rôle protecteur dans les systèmes biologiques implique la désactivation d'espèces électroniquement activées telles l'$^1O_2$ et la désactivation d'espèces chimiques réactives telles les radicaux peroxyles ($ROO^{\cdot}$) et alkyles ($R^{\cdot}$), qui peuvent être générés à l'intérieur des cellules et occasionner des dommages oxydatifs. Ils protègent également contre les

réactions de photosensibilisation. Ils ont la capacité de neutraliser, par un procédé de transfert d'énergie, des espèces qui se trouvent dans un état excité. Le bêta-carotène est le plus connu car le plus anciennement étudié, mais les autres caroténoïdes présentent des propriétés similaires (Delattre *et al*., 2005).

De très nombreux composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement antioxydant. c'es le cas des polyphénols (Ishikawa *et al*., 2001), des alcaloïdes, les phytates (Favier, 2003), xallophyls et des huiles essentielles (Sen *et al*., 2010).

**I.3.2.2. Antioxydants endogènes**

Il existe plusieurs composés endogènes synthétiques par les cellules et qui jouent le même rôle antioxidant. Les plus importants sont :

- **Le glutathion réduit.** Il est impliqué principalement dans la réduction des hydroperoxydes en particulier le peroxyde d'hydrogène grâce à la réaction catalysée par la GPx. Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C. Au cours de l'oxydation du glutathion, deux molécules de GSH se lient en formant un pont disulfure (S-S) par l'oxydation du groupement -SH de chaque cystéine. De cette réaction résulte la formation de GSSG (Figure 3). Les cellules de mammifères contiennent des concentrations millimolaires de GSH, alors que la fraction oxydée est deux à trois fois moins importante. Le GSH constitue le plus important groupement thiol des systèmes vivants, il pourrait agir comme pro-oxydant à cause de son pouvoir réducteur vis-à-vis du fer (Tessier et Marconnet, 1995).
- **Le Coenzyme Q10 (coQ10)**, appelé aussi ubiquinone, est un dérivé benzoquinolique. Il joue un rôle essentiel dans la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et est un puissant inhibiteur de peroxydation lipidique, en synergie avec la vitamine E (Langsjoen et Langsjoen, 2003).
- **La Bilirubine** est un produit terminal de la dégradation de l'hème et résulte essentiellement du catabolisme de l'hémoglobine par les cellules du système réticuloendothéliale (foie, rate et moelle osseuse) chez les mammifères. La billirubine est un composé non hydrosoluble, elle se lie à l'albumine, ce qui empêche sa pénétration dans des tissus riches en lipides tels que le cerveau. La bilirubine est capable de piéger des radicaux tels que $RO_2^{\cdot}$ et l'$^1O_2$, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).
- D'autres composés endogènes possèdes une activité antioxydante tels que l'acide urique (Simic et Jovanovic, 1989), mélanine (Korytowski *et al*., 1986), mélatonine (Delattre *et al*.,

2005), les thioredoxine, l'acide lipoique (Valko *et al*., 2006), les glutaredexine, les métallothionéines, ou les polyamines (Favier, 2003), l'albumine (Mira, 2008), les hormones sexuelles (Œstrogènes) (Keaney *et al*., 1994), les protéines non enzymetiques (transferrin, ferritin, ceruleoplasmin. etc) qui chélatent les métaux de transitions et inhibent ainsi leur effet prooxydant (réaction de Fonton) (Bonnefont-Rousselot *et al*., 2002).

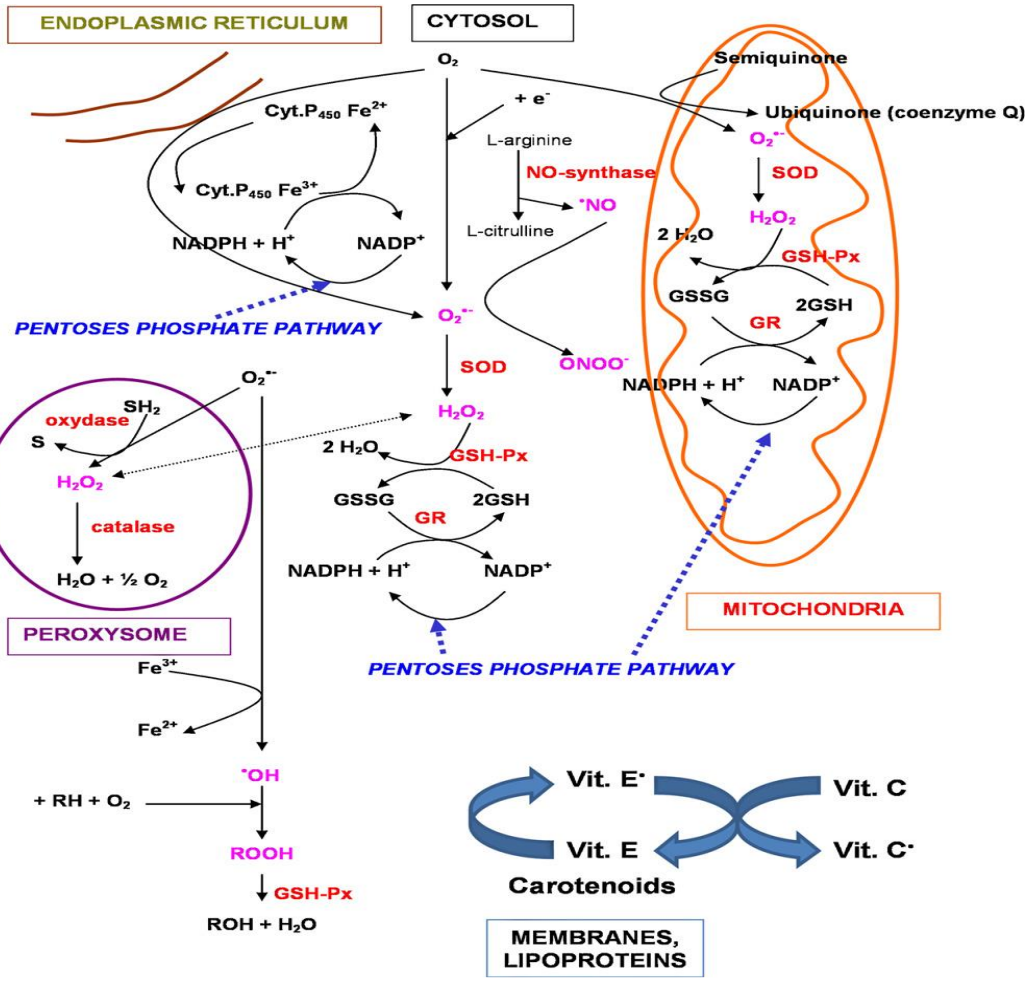



**Figure 3:** Les principales sources cellulaires d'ERO et d'RNS et les corrélations entre les défenses antioxydantes (Bonnefont-Rousselota et Collin, 2010).

### I.4. Stress oxydatif et dommages cellulaires

Lorsqu'il existe un déséquilibre entre la production de radicaux libres (ERO/ERN) et les défenses antioxydantes, les premiers seront produits à des concentrations plus élevées entraînant un stress oxydatif et un stress nitrosatif. Ces radicaux libres sont hautement réactifs. la réactivité et l'instabilité des ERO/ERN signifie la tendance de celles-ci à arracher un ou plusieurs électrons à d'autres molécules et seront par conséquant plus stables (Defeng, 2003 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006). Les ERO/ERN peuvent endommager

les trois classes importantes de molécules biologiques, y compris les acides nucléiques, les protéines et les lipides (Droge, 2002).

### I.4.1. Peroxydation lipidique

Les lipides et principalement les acides gras polyinsaturés comme l'acide arachédonique et l'acide linoléique, à cause de leurs doubles liaisons, sont la cible privilégiée de l'attaque par les ERO, plus particulièrement par le radical $OH^{\cdot}$. Dans un premier temps, ils se transforment en peroxydes lipidiques ($ROO^{\cdot}$). Cette réaction est appelée peroxydation lipidique (Floyd, 1990 ; Siems *et al*., 1995), sous l'action des métaux de transition (Fe, Cu) les $ROO^{\cdot}$ se décomposent ensuite en toute une séries de sous-produits toxiques que sont les aldéhydes et les hydrocarbures (Pincemail *et al*., 1999), dont les deux produits bien caractérisés, le malondéaldéhyde (MDA) et 4-hydroxynonenal (4-HNE) peuvent réagir et endommager les protéines, l'ADN et causent la mutagénèse (Floyd, 1990 ; Valko *et al*., 2006).

Le danger de cette peroxydation est associé principalement à l'oxydation des LDL et les phospholipides membranaires. Les conséquences de l'oxydation des LDL aboutissent à la formation de la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires (Pincemail *et al*., 1999), l'attaque des phospholipides membranaires modifiant de la fluidité membranaire et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et de transition des signaux (Deby-Dupont *et al*., 2002). Le MDA et 4-HNE représentent des marqueurs d'oxydation lipidique détectables par des tests biochimiques ou immunologiques (Garcia *et al*., 2005).

### I.4.2. Protéines

Tous les acides aminés peuvent être oxydés par les ERO et former des groupements carbonylés. Les plus sensible aux attaques radicalaires sont surtout ceux qui comportent un groupement sulfhydrile (SH) (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane, et histidine) (Davies, 2000). Les modifications des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines par les ERO/ERN sont à la base de la formation de dérivés protéiques carbonylés via plusieurs mécanismes incluant la fragmentation et l'oxydation des acides aminés (Pincemail *et al*., 1999). Les protéines modifiés perdent ainsi leurs propriétés biologiques (enzyme, récepteurs….) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment celles du protéasome (Defeng *et al*., 2003).

La diminution de groupements thiols ou la présence de protéines carbonylées, sont des marqueurs de l'oxydation de protéines, mesurables par différents tests biochimiques. La mesure des groupements thiols peut être réalisée grâce à la méthode d'Ellman, alors que la

détection des groupements carbonylés peut s'effectuer par des tests immunologiques (Western blot, ELISA) ou colorimétrique (Levine *et al*., 2000 ; Wehr et Levine, 2012).

### I.4.3. Oxydation d'ADN

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les ERO/ERN. Les bases qui composent cette molécule et particulièrement la guanine sont la cible de l'oxydation par $OH^{\cdot}$. L'oxydation peut aussi toucher la liaison entre la base et le sucre, ou attaquer le sucre lui-même conduisant ainsi à la cassure des brins (Favier, 2003 ; Floyd, 1990) alors que l'attaque des bases va modifient celles-ci, donnant ainsi des bases modifiées tel que: 8-hydroxyguanine, 5-hydroxymethuracil et glycol de thymine. Ces modifications peuvent conduir à la mutagénèse et la carcinogénèse (Valko *et al*., 2006).

La présence d'un stress oxydant, et l'oxydation des macromolécules, se traduit ensuite par le développement d'un très grand nombre de pathologies, tant aiguës que chroniques (stress oxydant prolongé) (Beaudeux *et al*., 2006), dont les plus importantes sont:

- Maladies cardiovasculaire: Athérosclérose (Droge, 2002), hypertension (Bonnefont-Rousselot *et al*., 2002).
- Cancers (Kanter, 1998 ; Huet *et al*., 2008).
- Maladies neurodégénératives: Alzheimer (Tuppo *et al*., 2001), maladie de Parkinson's, encéphalopathies spongiformes transmissibles (ESTs) (Droge, 2002), sclérose latérale amyotrophique *(*SLA*)* ( Bonnefont-Rousselot *et al*., 2010).
- Maladies inflammatoires (Kouakou-Siransy *et al*., 2010).
- Vieillissement (Minassian *et al*., 2006).
- Maladies respiratoires (Koechlin-Ramonatxo *et al*., 2006) comme l'asthme (Berger, 1997), et les maladies pulmonaires chroniques (Sen *et al*., 2010).
- Diabète mellitus (Huet *et al*., 2008).
- Maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde (Sen *et al*., 2010).
- Pathologies oculaires (cataracte et dégénérescence maculaire) (Berger, 1997).
- Maladies du fois et affections hépatiques (Defeng *et al*., 2003) , pancréatites, maladies rénales (Berger, 1997) et gastriques (Sen *et al*., 2010).

# II. La Polyarthrite Rhumatoïde (PR)

## II.1. Définition

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une forme de rhumatisme inflammatoire chronique « arthrites chroniques ». Elle est classiquement intégrée dans le groupe des maladies auto-immunes et de connectivités (Sany, 2003). La PR est cliniquement caractérisée par une inflammation articulaire (synovite) persistante et symétrique (Feldmann *et al*., 1996).

Dans l'articulation normale, les os sont en contact via l'interface cartilage–cartilage, lubrifiée par le liquide synoviale. La capsule est composée de tissu conjonctif et de la membrane synoviale. Cette dernière recouvre la plus grande partie de la surface intra-articulaire (Figure 4). Elle est composée de deux couches appelées intima et sub-intima. L'intima est généralement constituée de trois épaisseurs de cellules et elle est en contact directe avec les fibroblastes, les adipocytes et les cellules mononucléées. Dans l'articulation rhumatoïde, la membrane synoviale est épaissie, hyperplasique et elle projette des villosités dans la cavité articulaire (pannus). Ce pannus peut s'étendre sous le cartilage et sous l'os et causer des lésions cartilagineuses et osseuses menant à la destruction articulaire, visibles par radiographie. L'angiogenèse induit un infiltrat leucocytaire et un œdème (Burman *et al*., 2005). Cette destruction contribue finalement à une impotence fonctionnelle (Morel, 2004).

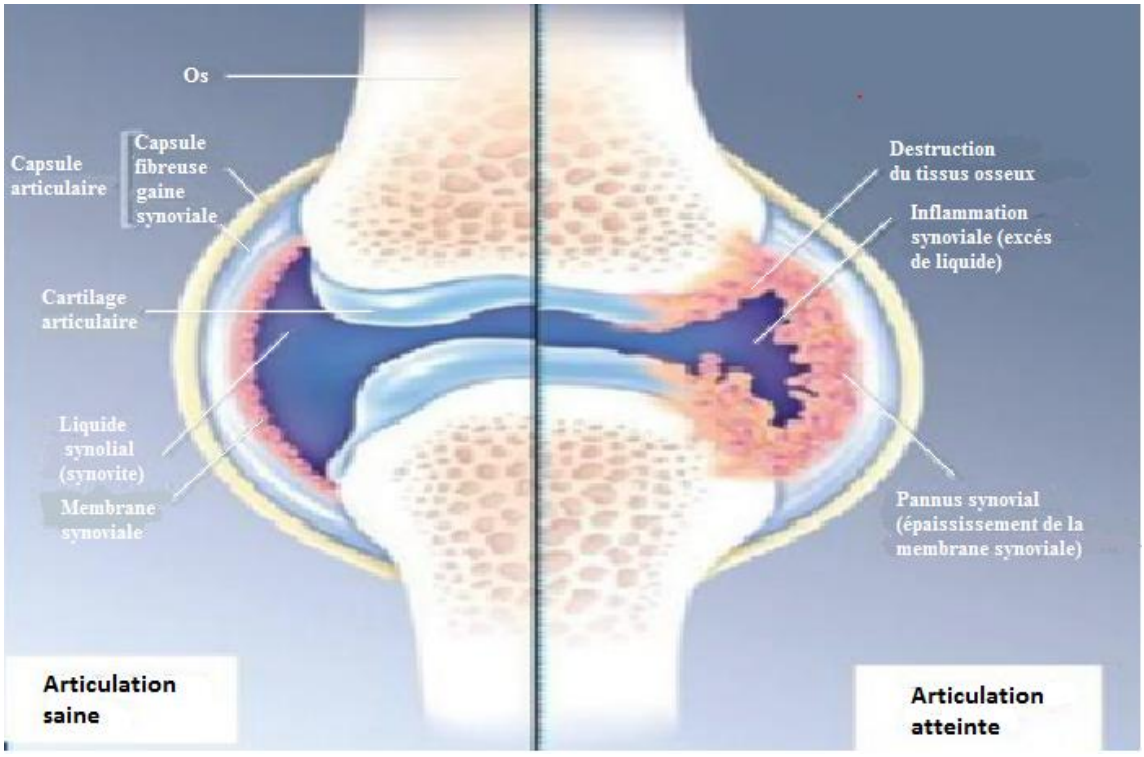



**Figure 4** : Destruction articulaire dans la PR (Juillard-Condat *et al*., 2007).

### II.2. Epidémiologie

La PR est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Elle touche généralement entre 0, 5 à 1% de la population (occidentale) de toutes les tranches d'âge (Alamanos *et al*., 2006), mais la majorité des cas surviennent entre 40 et 60 ans (lee *et al*., 2001 ; Carbonell *et al.*, 2008). Elle est trois fois plus fréquente chez la femme à cet âge mais cette différence de sexe-ratio s'attenue progressivement au-delà de 70 ans (Kaipiainen-Seppanen *et al.*, 1996).

Sa prévalence est en permanente augmentation dans le globe et ce loin de toutes particularités géographiques ou ethniques, mais il subsiste des exceptions (Alamanos *et al.*, 2006). En Algérie, la prévalence est faible, elle a été estimée à 0,15% (Slimani, 2014).
L'incidence de la PR est extrêmement variable d'un pays à l'autre et affecte chaque année entre 10–20/100 000 hommes et 20–40/100 000 femmes (Nepom et Nepom, 2002).

### II.3. Etiologie

La PR est une maladie hétérogène d'étiologie inconnue, faisant partie des maladies auto-immunes et des maladies systémiques. C'est une affection multifactorielle, où coexistent différents facteurs à l'origine de la maladie, notamment génétiques, environnementaux (Menkès *et al*., 2004) mais aussi hormonaux (Morel *et al*., 2004).
Malgré les nombreuses recherches menées sur la PR, le ou les antigènes responsables du déclenchement de la pathologie restent inconnus. Le dysfonctionnement immunitaire pourrait être du à des antigènes « endogènes » (comme le collagène, la glycoprotéine 39 du cartilage ou encore les facteurs rhumatoïdes, et les protéines citrullinés) ou encore des facteurs exogènes comme les agents infectieux, protéines du choc thermique…) (Sany, 2003).

#### II.3.1. Facteurs génétiques

Certains gènes entrainent une anomalie de la réponse immunitaire et de la réponse inflammatoire. Les études génétiques de liaison ont montré une association entre les formes destructives de PR et certains allèles du CMH de classe II. Ces allèles codent pour une séquence d'acides aminés définie située au sein de la région polymorphe bordant la cavité de liaison peptidique de l'HLA DR4. Cette séquence d'acides aminés est appelée « épitope partagé » (Gregersen *et al*., 1987). Les allèles à risque porteurs d'un épitope partagé, portés notamment chez les caucasiens par les gènes HLA DRB1*01 et 04 sont des facteurs de susceptibilité de la maladie. Ce sont surtout HLA DRB1*0401 et 0404 qui sont le terrain favorable principal de la PR. On sait aussi que ces gènes facilitent le

développement d'une PR plus sévère, surtout si le patient est porteur de 2 allèles à risque. D'autres gènes sont aussi décrits comme des gènes de succeptibilité à la PR tel que le gène PTPN 22. Néanmoins, chez les jumeaux, le poids de la génétique dans le déclenchement de la PR est inferieur à 30 %. Le reste relève de facteurs de l'environnement qui sont actuellement mal connus (Klareskog *et al*., 2006).

### II.3.2. Facteurs hormonaux

La PR est une maladie auto immune plus fréquente chez la femme. Le sexe-ratio est de (2:1 à 3:1) ceci reste insignifiant devant la thyroïdite d'Hashimoto (25:1 à 50:1). Les facteurs hormonaux ont été soupçonnés devant le fait que la PR prédomine chez la femme en période de ménopause. De plus, il existe une rémission fréquente pendant la grossesse, et souvent une poussée après l'accouchement. L'oestradiol peut influer sur la sécrétion de l'IFN- γ (interféron gamma) (Boki *et al*., 1993). Les récepteurs oestrogéniques sont présents à la surface des *fibroblast like synoviocytes* (FLS), leur activation entraine la sécrétion de métalloprotéases dans la synoviale qui participent dans la destruction cartilagineuse (Bengana *et al*., 2014). Tout ceci peut incriminer la part hormonale dans la genèse de la maladie.

### II.3.3. Facteurs de l'environnement

En effet, la variation de la prévalence de la PR d'une zone géographique ou d'un pays à une autre suggère que des facteurs de l'environnement peuvent influencer l'apparition de la maladie et peut être même son expression (Sany, 2003).

Les agents infectieux viraux ou bactériens sont parmi ces facteurs, dont les très répandus, le virus d'Epstein-Barr (EBV), la bactérie *Escherichia coli*, et les mycobactéries *Mycobacterium tuberculosis*. Ces facteurs ont été bien incriminés dans le déclenchement de la PR, par des mécanismes de mimétisme moléculaire de certains composants de ces agents infectieux avec des composants de l'articulation (Klinma, 2003 ; Berglin *et al*., 2010 ). À titre d'exemples : La protéine de choc thermique HSP 65 a une structure voisine avec une protéine présente dans le cytoplasme des cellules de la couche bordante de la membrane synoviale. L'HSP 70 *d'E. coli* est reconnu par l'épitope partagé de la molécule HLA-DR (Klinman, 2003).

Par ailleurs, il existe un mimétisme entre la glycoprotéine gp110 d'EBV et la séquence de susceptibilité des molécules HLA-DR1 et HLA-DR4 (Menkès *et al*., 2004). Ce mimétisme moléculaire pourrait expliquer le développent d'une immunité croisée (Sany, 2003).

D'autre part l'inflammation des gencives (périodontite, parodentite) a un lien avec la PR (Pablo *et al.*, 2008). La bactérie *Porphyromonas gingivalis* est l'agent principal des périodontites, chez les patients atteints de la PR. Le taux d'anticorps anti-*p.gingivalis* est plus élevé que chez les contrôles (Hitchon *et al.*, 2010). De plus *p. gingivalis* est le seul procaryote qui a une enzyme capable de citrulliner des protéines, le peptidylarginine désiminases (PAD) (Rosenstein *et al*., 2004), pourrait ainsi, une fois stimulée, développer des "citrullinations en chaîne" locales, est génèrent des épitopes citrullinés reconnus par les auto-anticorps dans la PR, contribuant ainsi au développement de la maladie (Rosenstein *et al.*, 2004 ; Goeb, 2011).

Le tabagisme, un autre facteur environnemental qui est fortement incriminé dans la PR, il a également la capacité d'augmenter la fréquence et la sévérité de la maladie. Il favorise la citrullination des peptides (Olsson *et al*, 2012 ; Svendsen *et al*., 2017). Ceci pourrait s'expliquer par l'interaction du tabagisme dans la réaction immunitaire innée ce qui rend les fumeurs plus exposés au déclenchement d'une PR que les non-fumeurs (Kuhn, 2006).

### II.4. Aspecst cliniques de la PR

#### II.4.1. Atteintes articulaires et tendineuses de la PR

La PR se caractérise par une très grande hétérogénéité clinique. Cette pathologie peut concerner toutes les articulations du corps. Cependant, les mains et les pieds sont les articulations les plus fréquemment (90%) touchées par la maladie.

L'aspect clinique d'un patient souffrant de PR est dominé par des douleurs articulaires, d'horaire "inflammatoire", associées à un gonflement des articulations (ou synovite) (Ritchie *et al.* 1968). L'atteinte est le plus fréquemment bilatérale et symétrique. Elle concerne principalement les petites articulations du carpe, les articulations méta-carpo-phalangiennes (MCP) et méta-tarso-phalangiennes (MTP). L'inflammation de la gaine des tendons (ou tenosynovite) est fréquente au niveau des muscles fléchisseurs de la main au stade initial de la maladie (Eshed *et al.* 2009). Une augmentation de la raideur articulaire en deuxième partie de nuit et le matin est également notée le plus souvent. Au stade précoce de la maladie, les destructions articulaires sont particulièrement importantes. Les érosions osseuses et la destruction cartilagineuse sont corrélées à un mauvais pronostic fonctionnel. De plus, les synovites itératives sont à l'origine de subluxations ou de luxations articulaires qui font le lit des ruptures tendineuses et de déformations des doigts (Maillefert *et al.* 2003) (Figure 5).

**Figure 5:** Différentes déformations des doigts dans la PR. **A** : polyarthrite rhumatoïde débutante avec notamment arthrosynovite des inter-phalangiennes proximales (aspect dit fusiforme des doigts), **C** : Déviation du « pouce en Z » - synovite des MCP avec subluxation et déviation en coup de vent cubital des doigts (http://www.cri-net.com/ (Le 20/06/2012)), **B** : Ténosynovite très caractéristique du cubital postérieur (Sany, 2003).

### II.4.2. Atteintes extra-articulaires de la PR

Les manifestations extra-articulaires confirment le caractère systémique de la PR (Combe, 2007). Elles existent chez 25 % à 40 % des patients, les plus fréquentes sont les nodules rhumatoïdes, présents dans environ 20 % des cas, siégeant surtout à la face postérieure de l'avant-bras et du coude. Ils se développent après quelques années d'évolution. Un syndrome de Gougerot-Sjögren est constaté chez un patient sur six (Carmona *et al.* 2003; Cimmino *et al.* 2000). Les atteintes pulmonaires, principalement des bronchectasies, touchent environ 2,5% de la population souffrant de PR (Carmona *et al.* 2003). La luxation atloïdo-axoidienne, pouvant entraîner une compression médullaire, complique environ 10 % des PR. Elle est recherchée systématiquement afin de ne pas méconnaitre une compression médullaire cervicale. Les vascularités, l'amylose secondaire et le syndrome de Felty (associant une splénomégalie et une leuconeutropénie) sont des complications graves mais plus rares (≤1% des patients) qui surviennent dans des PR anciennes (Cimmino *et al.* 2000).

## II.5. Physiopathologie de la PR

L'établissement de la polyarthrite rhumatoïde s'associe à une inflammation de la membrane synoviale, appelée synovite rhumatoïde, aboutissant secondairement à la destruction du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral. Le mécanisme immuno-pathologique de la PR peut se résumer en trois phases très intriquées : initiation, recrutement et inflammation, destruction articulaire (Figure 6).

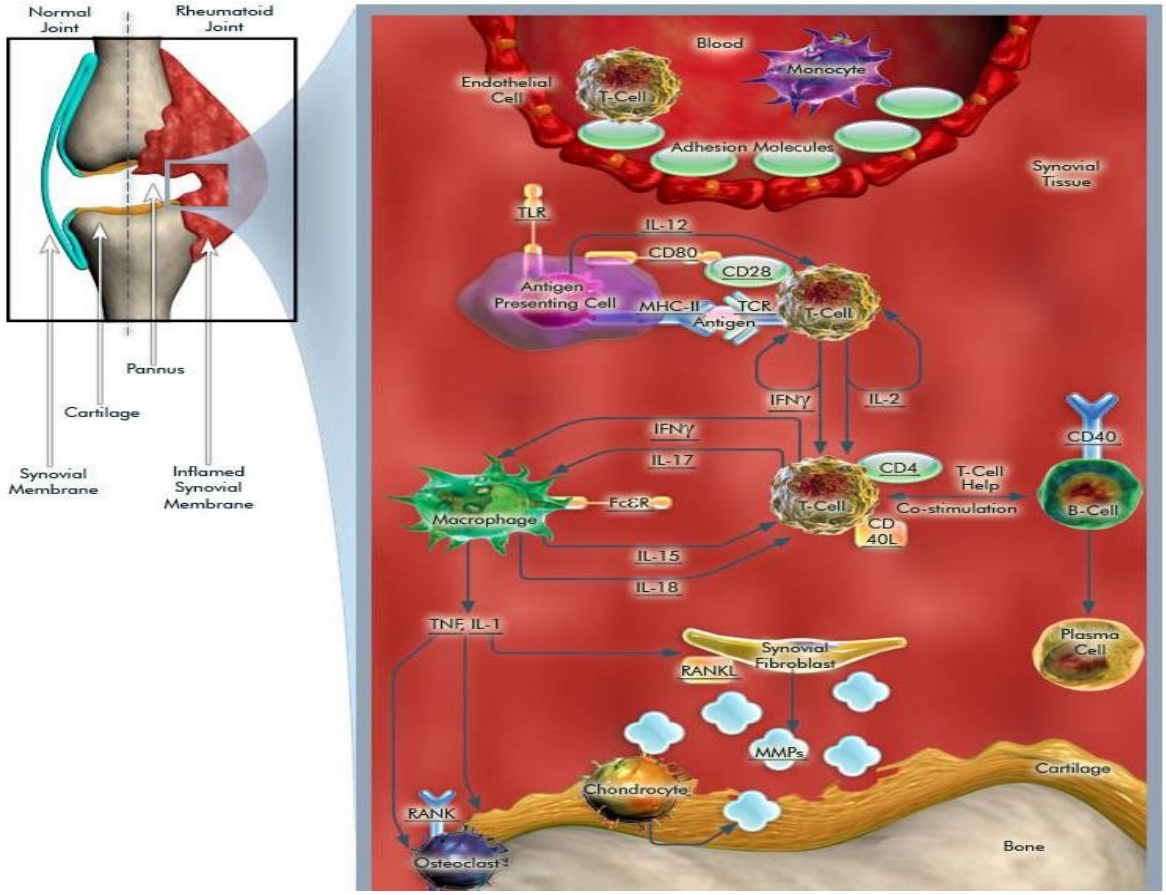



**Figure 6** : Représentation schématique des évènements cellulaires intervenant au cours de la polyarthrite rhumatoïde (http://www.ebioscience.com/resources/pathways/pathogenesis-of-rheumatoidarthritis.htm).

### II.5.1. Phase d'initiation

La phase d'intiation est la moins bien connue à ce jour, du fait que le facteur déclenchant est inconnue. Cependant la très grande spécificité des anticorps dirigés contre les protéines citrullinées laisse supposer que l'antigène qui déclenche cette phase est probablement riche en résidus citrullinés (Radideau *et al*., 2010).

Les lymphocytes T (LT) notamment les LT CD4+ et les mécanismes de l'immunité innée joueraient un rôle principal dans cette initiation, l'antigène serait présenté par des molécules du système HLA de classe II (comme DR4 ou DR1 par exemple) situés sur une cellule présentatrice d'antigène (ou CPA) aux lymphocytes T CD4+ (Figure 6). Les cellules dendritiques (CD) sont supposées être les cellules qui présentent initialement l'antigène aux lymphocytes T dans la PR (Pettit et Thomas, 1999), proviennent du sang périphérique. Sous l'effet des chimiokines dans la synoviale et plus précisément dans l'infiltrat lymphocytaire (Page *et al*., 2002). Le complexe formé par l'antigène, la molécule HLA de classe II, et le TCR du lymphocyte T est considéré comme déclencheur de la

physiopathologie de la PR (Radideau *et al*., 2010). Les lymphocytes naïfs (Th0), après reconnaissance d'un antigène, vont se différencier en plusieurs types de LT, les lymphocytes Th1 sont particulièrement abondants dans la synoviale rhumatoïde, produisent d'interféron-γ, d'IL-2. Cette réponse est dite de type Th1 par opposition à une réponse de type Th2 qui se traduit plutôt par une production d'IL-4 (Berek et Schroder, 1997 ; Panayi et *al*., 2001), un autre type de LT, distinct des LT Th 1 et Th 2, sécrétant de l'IL-17, a été identifié et nommé Th17 et ont un rôle pro-inflammatoire dans la PR (Bettelli *et al.*, 2007).

### II.5.2. Phase de recrutement et d'inflammation de la synoviale

A l'inverse de la phase d'initiation, cette seconde étape est principalement dépendante de l'immunité acquise. Le recrutement cellulaire et l'inflammation au niveau de la synoviale rhumatoïde implique de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires (cytokinique).

- **Acteurs cellulaires**

Après la phase d'initiation, les lymphocytes T recrutés à partir du sang périphérique acquièrent alors un phénotype Th1 et s'organisent en agrégats qui ressemblent par leur morphologie à l'architecture folliculaire des ganglions lymphoïdes, avec également la présence de veinules postcapillaires (*high endothelial venules*). L'activation de ces lymphocytes T est sous le contrôle des lymphocytes T régulateurs CD4+ et CD25+. Ces lymphocytes T régulateurs sont capables d'inhiber l'expansion clonale des lymphocytes T CD4+ (Cao *et al*., 2003). Les lymphocytes T activés interagissent avec les cellules endothéliales qui composent l'endothélium des veinules postcapillaires (Shimizu *et al*., 1992). Ces cellules endothéliales sont activées par des cytokines produites par les monocytes ou les lymphocytes T activés. Ces cellules activés expriment alors des molécules d'adhésion, d'abord des sélectines, puis des intégrines, qui interagissent entre elles (Damle *et al*., 1991). L'interaction lymphocyte T/ cellules endothéliales permet la diapédèse et le recrutement d'autres lymphocytes T circulants qui passent alors dans la membrane synoviale. Les lymphocytes T migrent ensuite dans la synoviale en exprimant à leur surface membranaire des récepteurs aux chimiokines produites dans la synoviale (Oppenheimer-Marks *et al*., 1991). Les lymphocytes T, nouvellement arrivés dans la synoviale, produisent à leur tour des cytokines de type Th1 qui activent les cellules résidentes : lymphocytes B, macrophages résidents, cellules endothéliales et fibroblastes. Celles-ci libèrent à leur tour des chimiokines et des molécules d'adhésion qui favorisent le recrutement de monocytes et de polynucléaires neutrophiles circulants participant donc à

l'amplification de la réaction immunitaire et inflammatoire (Korganow *et al*., 1996). L'ensemble du processus de recrutement des cellules circulantes du compartiment sanguin vers le compartiment synovial est appelé l'adressage ou *homing* (Jalkanen *et al*., 1986). Les lymphocytes T interagissent ensuite avec les cellules résidentes. Ce contact intercellulaire direct est possible grâce à des molécules d'adhésion comme le système aEb7/E-cadhérine (Trollmo *et al*., 1996). Les synoviocytes en contact direct avec des lymphocytes T produisent de nombreux médiateurs de l'inflammation mais aussi de la destruction ostéo-cartilagineuse (Burger *et al*., 1998 ; Chabaud *et al*., 2001). Les lymphocytes T interagissent aussi avec les macrophages et les cellules présentatrices de l'antigène, amplifiant ainsi la réaction inflammatoire (Aarvak et Natvig, 2001). Si l'importance des lymphocytes T est indiscutable dans la maladie, leur présence n'est pas indispensable à l'entretien de l'inflammation locale de l'articulation qui dépend plus des synoviocytes.

Les synoviocytes constituent le principal composant cellulaire de la couche bordante de la membrane synoviale avec deux types de synoviocytes : les macrophages (Synoviocytes A) et les synoviocytes fibroblastiques (Synoviocytes B, ou Fibroblast-like synoviocytes (FLS)) (Firestein *et al*., 1990). Les synoviocytes macrophagiques activés seraient les véritables moteurs de la réaction inflammatoire en produisant deux types de médiateurs : des médiateurs « primaires » ne nécessitant pas de synthèse protéique tels que les prostaglandines, les leucotriènes, les radicaux libres et les enzymes contenues dans les granules et qui participent de façon importante à la destruction tissulaire et des médiateurs secondaires requérant une synthèse protéique constituée principalement par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF-α (Russo-Marie, 1996).

Les LB interviennent aussi dans la formation de la synovite rhumatoïde. Leur contribution dans la pathogénie de la PR se situe à plusieurs niveaux. Les lymphocytes B peuvent se comporter comme de véritables CPA car ils sont capables de présenter des antigènes aux lymphocytes TCD4+. En effet, grâce aux facteurs rhumatoïdes membranaires, ils captent très efficacement des complexes immuns (Tighe *et al*., 1993). La « B cell activating factor belonging to the TNF family » ou BAFF est une cytokine synthétisée par les monocytes/macrophages et les CDs et qui influence l'activation des LB (Cheema *et al*., 2001). Les LB ainsi activés vont se différencier en plasmocytes capables de sécréter de nombreuses immunoglobulines. Parmi ces anticorps on trouve les facteurs rhumatoïdes, les anticorps anti-CCP, ou encore certains anticorps spécifiques du collagène de type II. Les

LB activés sécrètent également des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α (Dorner et Burmester, 2003).

- **Acteurs Cytokiniques**

Les cellules citées précédemment communiquent entre elles par contact de cellule à cellule ou en utilisant des messagers intercellulaires appelés cytokines. Dans la PR, il existe un déséquilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires. L'IL-17 produit par les lymphocytes T (Miossec, 2003) et Les cytokines produites par les synoviocytes, telles que le TNF-α, l'IL-1, l'IL-15, l'IL-18, l'IL-6, mais aussi les facteurs de croissance et les chimiokines, sont présentes à des concentrations élevées dans le liquide synovial et dans le sérum des patients atteints de PR (Firestein *et al*., 1990 ; Alvaro-Gracia *et al*., 1991).

**L'IL-1β et le TNF-α** sont des médiateurs clefs de l'inflammation, produits principalement par les macrophages. Ils contrôlent la production de nombreuses cytokines comme le *fibroblast growth factor (FGF),* le *vascular endothelial growth factor (VEGF)* et les chimiokines, des molécules d'adhésion qui interviennent également dans la réaction inflammatoire en favorisant l'angiogenèse indispensable au recrutement des cellules inflammatoires sanguines dans la synoviale (Bresnihan *et al*., 1998 ; Jiang *et al*., 2000 ; Smeets *et al*., 2003).

**L'IL-17 et l'IL-18** induisent l'expression de nombreux médiateurs de l'inflammation par activation du facteur de transcription NF*k*B (Miossec, 2003 ; Morel *et al*., 2001). L'IL-17 produit par les LT Th 17 sous le contrôle d'IL-6 (Aggarwal *et al.*, 2003), stimule la production de métallo-protéases par les ostéoblastes et les chondrocytes. Elle augmente l'expression du RANK-ligand par les ostéoblastes (Miossec *et al.*, 2003).

**L'IL-6** est produite uniquement en situation pathologique par plusieurs types de cellules (LT, LB, fibroblastes, cellules endothéliales, monocytes) en réponse à différents stimuli (IL-1, TNF-α, IFN-γ). Elle est un acteur central de la phase aiguë de l'inflammation. L'IL-6 induit la production d'auto-anticorps par les plasmocytes mais n'a pas de rôle sur leur prolifération. Elle entraîne l'activation et la prolifération des LT dans le thymus via l'IL-2. Elle a également un rôle dans la destruction osseuse en activant les ostéoclastes (Park *et al.*, 2007).

Touts ces cytokines, une fois fixées sur un récepteur membranaire, elles provoquent l'activation des voies de signalisation intracellulaire, aboutir à l'activation des gènes codant pour d'autres molécules impliquées dans l'inflammation comme les chimiokines et

les molécules d'adhésion, mais aussi dans la synthèse des métalloprotéinases responsables de la destruction cartilagineuse ou la synthèse des prostaglandines (Herlaar et Brown, 1999 ; Berenbaum *et al*., 2003).

### II.5.3. Phase de destruction

Les lésions cartilagineuses et osseuses résultent principalement de la prolifération pseudotumorale de la synoviale (notamment formation de pannus synovial) de l'action des cytokines (Genovese *et al.*, 2002), et de l'action des métalloprotéases, des chondrocytes et des ostéoclastes (Baclé, 2012). La prolifération du synovial est induise par L'IL-1 et le TNF-α (Feldmann et Maini, 2001). L'attachement des synoviocytes sur le cartilage grâce à diverses molécules d'adhésion donne le pannus synovial. Ce dernier est donc majoritairement constitué de macrophages et de fibroblastes (cellule constituant la membrane synoviale) mais il peut aussi comporter une faible proportion d'ostéoclastes. Il semblerait que les fibroblastes soient les principaux responsables des lésions cartilagineuses induites par le pannus tandis que les macrophages faciliteraient l'extension et le développement du pannus. Les macrophages joueraient le rôle d'amplificateur par l'intermédiaire des molécules qu'ils libèrent (IL-1, TNF-α, molécules d'adhésion comme VCAM-1, facteurs angiogéniques…).

Le pannus, principalement par l'intermédiaire des fibroblastes activés, va également participer à la libération de métalloprotéases (collagenases, gelatinases…). Ce sont ces enzymes catalytiques agissant sur les protéines matricielles qui vont dégrader le cartilage et l'os sous-chondral. Les métalloprotéases sont activées par les cytokines pro inflammatoires. Les cellules constituant le cartilage, les chondrocytes, peuvent également sécréter des collagénases et des prostaglandines après stimulation par l'IL-1 (Baclé, 2012).
De sa part, les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuse. Ils se fixent à la matrice osseuse par l'intermédiaire de protéines d'adhésion. Ces cellules peuvent être stimulées directement par le TNF-α, l'IL-1 ou encore les prostaglandines. Elles peuvent être également activées par le système RANK/RANK-Ligand. C'est un système non spécifique de la PR faisant le lien entre le système immunitaire et le métabolisme osseux. Le RANK-Ligand est une molécule appartenant à la superfamille du TNF-α et qui est activée par ce dernier et par l'IL-1 (Hofbauer *et al*., 1999), et aussi par l'IL-17 (Hofbauer *et al*., 2001). Le RANK-Ligand est exprimé à la surface des ostéoblastes, des LT activés, des macrophages, des monocytes, des cellules endothéliales (Collin-Osdoby *et al*., 2001) et des fibroblast-like synoviocytes (FLS) (Prete *et al*., 2011).

Le RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B) qui est le récepteur du RANK-Ligand est pour sa part exprimé au niveau des membranes cellulaires des cellules dendritiques, des précurseurs des ostéoclastes et des ostéoclastes matures (Takayanagi *et al*.,2000).

l'interaction RANK/RANKL sur des macrophages attirés et sensibilisés par le M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) induira leur fusion et la formation de l'ostéoclaste mature (Prete *et al*., 2011). L'interaction RANK/RANKL est donc capitale pour la formation et l'activation d'ostéoclastes entrainant les lésions osseuses (Takayanagi *et al*., 2000 ; Prete *et al*., 2011).

L'ostéoprotégérine (OPG) est secrétée par de nombreux tissus et neutralise le RANK ligand en agissant comme un récepteur soluble (Hofbauer *et al*., 2001). L'IL-1 augmente la formation d'ostéoclastes par une action stimulant la synthèse de M-CSF. Cet effet de l'IL-1 est à l'état physiologique inhibé par les oestrogènes (Beavis *et al*., 2011).

### II.6. Diagnostic de la PR

Le diagnostic de PR est fondé sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques (Haute Autorité de Santé 2007).

#### II.6.1. Signes cliniques

Le diagnostic de PR, selon les recommandations de la HAS, sera d'autant plus probable que les signes suivants sont présents (Haute Autorité de Santé 2007) :

- une raideur matinale supérieure à 30 min ; une durée d'évolution des symptômes supérieure a 6 semaines ; une arthrite touchant au moins 3 articulations ; une arthrite touchant les poignets ou les métacarpo-phalangiennes et les interphalangiennes proximales des mains ; une douleur à la pression des métatarso-phalangiennes ; une atteinte symétrique.

L'apparition des lésions érosives articulaires caractéristiques, souvent après quelques mois de suivi, viendra confirmer le bien fondé du diagnostic.

Rappelons toutefois que l'absence de signes cliniques articulaires ne suffit pas pour autant pour éliminer le diagnostic de PR puisque certains d'entre-eux ont un début biologique pur.

#### II.6.2. Bilan biologique

L'exploration biologique peut avoir une valeur indicative confirmant l'orientation du diagnostic. Il s'agit d'un syndrome inflammatoire associé à une positivité des anticorps anti-nucléaires (10-30 %) et du facteur rhumatoïde (FR), anticorps de type IgM anti-

gammaglobuline, et aussi par mesure de la vitesse de sédimentation (VS) et le dosage de la protéine C (CRP). Les résultats de ces examens ne sont toutefois pas assez discriminants pour le diagnostic de la PR contrairement aux anticorps anti-peptides citrullinées (ACPA pour "anti-citrullinated protein or peptide auto anti-bodies") dont la spécificité est excellente (Schellekens *et al.* 2000). Cependant au stade initial, la sensibilité des ACPA n'est que de 40 à 60 % (Combe *et al.* 2007).

### II.6.3. Bilan radiologique

Les érosions sur les radiographies des mains et des avant-pieds semblent être le critère le plus fiable. En effet, L'existence d'érosion osseuse sur les radiographies standards dans le cadre d'une polyarthrite débutante est fortement évocatrice d'une PR, mais ils peuvent montrer à ce stade une déminéralisation osseuse (épiphysaire) périarticulaires et un œdème des parties molles périarticulaires (Combe, 2007). L'échographie et l'imagerie par résonnance magnétique offrent une sensibilité supérieure (Baillet *et al.* 2011) et permettent de faire le diagnostic avant l'apparition de lésions radiographiques. Si la PR est déjà évoluée, les radiographies, à ce stade, mettront en évidence des érosions caractéristiques et des pincements des interlignes articulaires (Bonnevialle *et al*., 2001).

## II.7. Stress oxydatif et PR

### II.7.1. Implication des ERO dans la pathologie de la PR

La faible demi-vie des ERO (de l'odre de la milliseconde) et leur haute réactivité rendent difficile la démonstration directe de leur implication dans la physiopathologie de la PR (Marklund, 1982). Cependant de nombreux arguments sont en faveur de l'implication des ERO dans l'entretien de l'inflammation chronique observée dans la pathologie de la PR.

L'estimation du taux des polynucléaires dans le liquide synovial des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, constituent plus de 90% des cellules retrouvées. Ces cellules sont capables de produire des quantités importantes d'anions $O2^{\bullet-}$ puis, par dismutation, du peroxyde d'hydrogène (H2O2), après stimulation par les cytokines pro-inflammatoires produites en quantité importante par les monocytes, macrophages et les synoviocytes. Après activation, ces cellules libèrent les ERO parallèlement à leur dégranulation dans le milieu extracellulaire, ces ROS interagissent avec les enzymes dégranulées par les PNN. Ainsi, $H_2O_2$ est converti par la myéloperoxydase (MPO) en acide hypochloreux (HOCl) hautement réactif. L'activation des polynucléaires peuvent être par d'autres molécules telles que les complexes immuns, les agrégats d'immunoglobulines, et certaines fractions du complément (Dewar et Harth, 1994 ; Contis *et al.,* 2014).

L'implication des ERO dans la physiopathologie de la maladie s'explique également par les modifications moléculaires induites. Les conséquences en sont une dégradation de la matrice extracellulaire du cartilage et une altération des immunoglobulines à l'origine de la formation de complexes immuns dans le liquide articulaire (Delattre *et al*., 2005).

Une autre enzyme responsable de la production de l'$O2^{\bullet-}$, est la XO. L'augmentation de l'activité et la concentration de cette enzyme dans le sérum et la membrane synoviale des patients atteints de la PR, a été également constaté (Miesel et Zuber, 1993 ; Pacher *et al*., 2006 ; Hanachi *et al*., 2008).

La présence d'ERO dans le pannus rhumatoïde a pu être révélée par une augmentation des lésions qu'ils engendrent sur la matrice extra-cellulaire, les lipides, les protéines. L'acide hyaluronique est la principale macromolécule retrouvée dans le liquide synovial et un important constituant des agrégats de protéoglycannes du cartilage. De par sa masse moléculaire importante (de l'ordre de $7.10^6$ Da), il a pour rôle d'assurer la viscosité du liquide articulaire. Lors de la PR, il est observé une diminution de la viscosité du liquide synovial. La dégradation de l'acide hyaluronique peut se faire selon deux voies : l'une implique des enzymes spécifiques, les hyaluronidases, l'autre des espèces chimiques hautement réactives telles les ERO, cette deuxième voie semble être la plus probable. L'implication des RL dans la dégradation de l'acide hyaluronique à des molécules de bas poids moléculaire ($10^4$ Da) a été largement démontrée (Myint *et al*., 1987 ; Hoffman et Schmut, 1980).

L'augmentation des résidus carbonyles traduit l'attaque radicalaire des protéines du liquide synovial de PR (Dalle-Donne *et al.,* 2003). De nombreuses protéines présentes au niveau articulaire sont sensibles à l'attaque radicalaire. Ainsi, la partie protéique des protéoglycannes du cartilage peut être dégradée par l'action de l'anion $O2^{\bullet-}$ ou des radicaux $OH^{\cdot}$ (Dean *et al*., 1980). De même, le collagène est altéré par les RL (Monboisse *et al*., 1983), alors que l'élévation de la 8-oxo-7-déoxyguanosine dans les noyaux des lymphocytes et des PMNs circulants est un stigmate des dégâts produits sur l'ADN. Il existe également des traces d'une peroxydation lipidique accrue dans cette pathologie (Dai *et al.* 2000). Une diminution des capacités antioxydantes, notamment l'activité antioxydante des SOD, CAT et des systèmes GSH et Trx a été également noté lors de la polyarthrite rhumatoïde, (Cimen *et al*., 2000 ; Jikimoto *et al*., 2001). Les études épidémiologiques indiquent que la consommation de molécules anti-oxydantes (Vit C et Vit E) réduit le risque de développer une PR (Mulherin *et al.,* 1996 ; Cerhan *et al.,* 2003).

### II.7.2. Rôle pathogénèse des ERO dans la PR

Plusieurs résultats expérimentaux indiquent que l'augmentation de la production de ERO au sein du pannus rhumatoïde est un élément majeur dans l'étiopathogénèse de la réaction auto-immune et de la protéolyse matricielle (Kaur *et al.* 1996) à l'origine de la destruction articulaire de la PR (Allen *et al.* 1989; Blake *et al.* 1989; Merry *et al.* 1991) (Figure 7).

Les ERO sont capables de modifier les liaisons intra et inter moléculaires des immunoglobulines (Kleinveld *et al*., 1988). Ces immunoglobulines modifiées sont alors capables de se lier aux facteurs rhumatoïdes, de se fixer à la fraction C1q du complément et d'activer cette voie (Swaak *et al*., 1989).

Les ERO engendrent la dépolymérisation de l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire, en molécules de bas poids moléculaire aux propriétés pro-inflammatoires susceptibles de stimuler les récepteurs de l'immunité innée TLR-2 (Scheibner *et al.* 2006), et ainsi de promouvoir une réponse inflammatoire. Ces fragments, sont ainsi assimilables à de véritables signaux de danger à l'instar des polysaccharides bactériens et des nucléotides viraux (Matzinger, 2002). De plus, la dépolymérisation de l'acide hyaluronique altère les propriétés rhéologiques du liquide articulaire. La diminution de viscosité du liquide articulaire de PR est responsable d'une modification de la répartition biomécanique des charges sur le cartilage articulaire, accélérant sa dégradation. En plus de la diminution de viscosité du liquide articulaire, les ERO modifient la fonction chondrocytaire et contribuent à la dégradation cartilagineuse par un mécanisme direct de chondrolyse et un mécanisme indirect d'induction des protéases dégradant la matrice extracellulaire. La diminution de viabilité du chondrocyte, alors incapable de pallier la dégradation physiologique de la matrice extra-cellulaire, est un phénomène important dans le développement des lésions cartilagineuses (Hashimoto *et al.,* 1998). La production d'anions $O2^{\bullet-}$ et radicaux hydroxyles est responsable de l'apoptose des chondrocytes dans la PR, vraisemblablement en favorisant la formation du peroxynitrite $ONOO^-$ (Del Carlo *et al.,* 2002). De plus, la production d'ERO conduit à une diminution de synthèse de la matrice extra-cellulaire par les cellules résidantes de l'articulation. Le peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$ inhibe la synthèse de protéoglycane par le chondrocyte (Vincent *et al.,* 1989) en freinant la glycolyse au niveau de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Baker *et al.,* 1989). Enfin, les ERO activent la voie NF-κB des PNN, impliquée dans la synthèse de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires (Contis *et al*., 2014). Des travaux ont montré que le ciblage de la production d'ERO dans différents modèles

animaux arthritiques, permettrait une diminution de l'inflammation articulaire, corrélant avec une baisse de production d'ERO des monocytes et des PMNs murins (Kroger *et al.*, 1997).

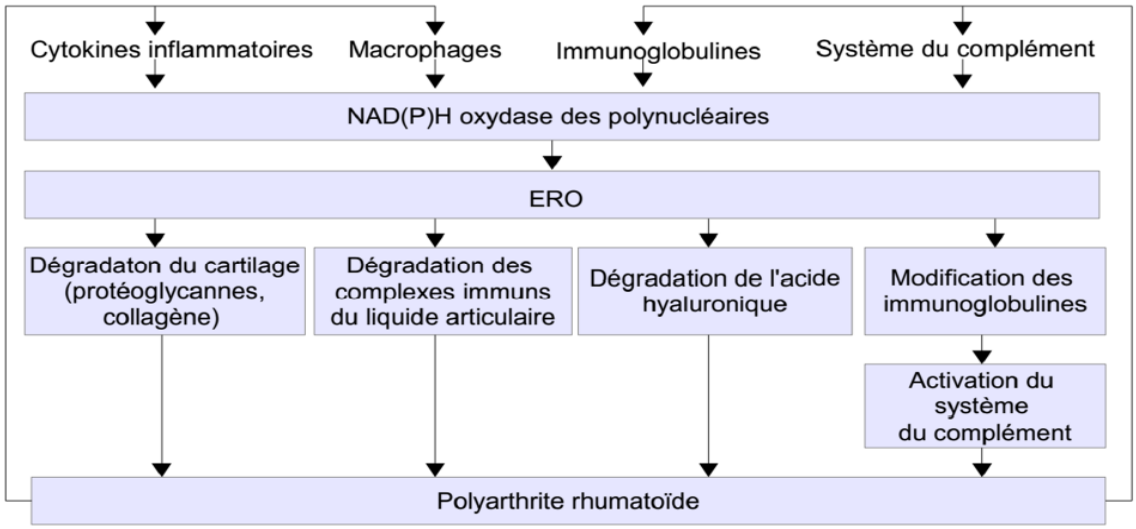



**Figure 7**: L'interaction du stress oxydant avec la polyarthrite rhumatoïde (Bennamara, 2017).

### II.8. Thérapeutique et Stratégies d'inhibition de la PR

Les objectifs thérapeutiques de la PR se diffèrent selon le stade d'évolution de la maladie: à court terme, l'obtention d'une rémission précoce de la maladie est un objectif primordial; à moyen terme, la prévention des érosions et des déformations articulaires. A plus long terme, l'objectif est de prévenir l'handicap locomoteur et de réduire la mortalité. Trois grandes classes de médicaments sont actuellement disponibles pour le traitement de la PR :

#### II.8.1. Les corticostéroïdes

La corticothérapie générale (prednisone, prednisolone) est un puissant anti-inflammatoire, très souvent prescrit au cours des PR débutantes ou avérées et dont l'efficacité à court terme sur les signes inflammatoires est démontrée. Son emploi est limité par les effets indésirables bien connus de toute corticothérapie prolongée : fragilité cutanée, rétention hydrosodée et hypertension artérielle, susceptibilité aux infections, troubles psychiques, ostéoporose, ostéonécrose aseptique, myopathie proximale, diabète et cataracte.

L'intérêt de la corticothérapie pour prévenir et retarder les destructions articulaires de la PR reste controversé. Certaines études ne montrent aucun bénéfice structurale (Capell *et al.*, 2004), alors que d'autres études montrent l'efficacité structurale de la corticothérapie à faible dose au cours des PR débutantes, en association avec les traitements de fond (Svensson *et al.*, 2005 ; Kirwan, 2007).

### II.8.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont généralement prescrits en première intention au cours des premières semaines d'évolution d'une PR, avant l'établissement du diagnostic. Ils sont efficaces sur les douleurs inflammatoires, les gonflements et la raideur matinale, mais ces médicaments utilisés seuls n'empêchent pas la progression clinique ni structurale de la maladie, et leur emploi est recommandé en association avec un traitement de fond. Le risque de complications gastro-intestinales (ulcère gastroduodénal, hémorragies, perforations) et rénales (rétention hydrosodée, insuffisance rénale aiguë) impose une vigilance particulière et souvent une protection gastrique par inhibiteurs de la pompe à protons (Jacobs, 1992).

### II.8.3. Les traitements de fond

Encore appelés *disease modifying anti-rheumatic drugs* (DMARD) dont il existe deux groupes :

#### II.8.3.1. Les traitements de fond conventionnels (*synthetic* DMARD)

Ces thérapeutiques ont en commun la capacité à contrôler les manifestations inflammatoires cliniques de la maladie et à freiner son évolution destructrice, l'efficacité de ces traitements, dits de fond, est en général retardée (un à trois mois), rémanente (reprise d'activité après l'arrêt du traitement), et malheureusement inconstante. Ils doivent donc être constamment adaptés à l'activité inflammatoire et à la sévérité de la maladie **(**Hayder, 2011**)**. Parmi ces traitements, on retrouve : le Méthotrexate (actuellement le premier traitement de fond recommandé devant toute PR débutante) (Braun *et al*., 2008), Le Léflunomide (Dayer et Cutolo, 2005), La Sulfasalazine (Liptay *et al.,* 1999

#### II.8.3.2. Les biothérapies (*biologic* DMARD)

Ces médicaments, issus d'une meilleure connaissance de la physiopathologie de la PR sont des molécules synthétiques, dirigées contre une cible spécifique de la réponse immunitaire. Il peut s'agir d'anticorps monoclonaux, ou de protéines de fusion, capables de détruire, ou d'inactiver une cytokine (TNF-α, IL-1, et IL-6), de neutraliser une cellule immunitaire (Lymphocyte B), ou d'empêcher son activation (Carli *et al*., 2009).

Parce que ces traitements actuels de l'arthrite sont inefficaces, produisent des effets secondaires importants et ont tendance à être chers, les produits naturels, qui sont dépourvus de tels inconvénients, offrent de nouvelles possibilités de traitement (Hak et Choi, 2008 ; Sale *et al*., 2008).

# III. La curcumine

## III.1. Histoire

La curcumine, est un dérivé polyphénolique faisant partie de groupe chimique phénolique des curcuminoïdes, isolées principalement du rhizome de curcuma (*Curcuma longa L*), une plante vivace appartenant à la même famille que le gingembre, les *Zingiberaceae (*Grykiewicz et Silfirski, 2012*)*. Elle est le principale curcuminoïde, qui représente environ 90% de la teneur en curcuminoïdes du curcuma, suivi de la déméthoxycurcumine et de la bisdéméthoxycurcmine (Ruby *et al*., 1995), représentant 2 % à 8 % du curcuma (Sharma et *al*., 2005). Historiquement c'est au début du 19$^{ème}$ siècle que la curcumine, le principe responsable de la coloration du *Curcuma longa*, a été isolé pour la première fois par Vogel (1842), puis caractérisée chimiquement par Milobedeska et Lampe (1910), puis ils en publient la synthèse de la curcumine en 1913 (Milobedzka *et al*., 1910 ; Lampe et Milobedzka, 1913). Elle est employée pendant des siècles, en particulier dans la cuisine du Sud-Est de l'Asie, plus spécifiquement de l'Inde, comme épice dans de nombreux aliments, pour ses propriétés alimentaires (aromate, colorant, conservateur, stimulant), ainsi que pour ses propriétés médicinales dans les pratiques de médecine traditionnelle (Sharma *et al*., 2005). En effet, le curcuma est utilisé depuis le 2$^{e}$ millénaire avant J.-C. en médecine traditionnelle dans la médecine ayurvédique (médecine traditionnelle indienne) pour traiter, entre autres, les problèmes gastro-intestinaux, les infections, les rhumes, les maux de tête, des troubles inflammatoires ou, localement, pour le traitement des blessures. L'intérêt de la médecine moderne a été éveillé lorsque des chercheurs indiens, en 1971, ont apporté les preuves que le curcuma avait des propriétés anti-inflammatoires, Cette action est liée à la présence de la curcumine (Arora *et al*., 1971). Depuis, la curcumine a fait l'objet de centaines de publications étudiant ses propriétés anti-oxydante, anti-inflammatoire, anti-virale, anti-fongique (Ammon *et al*., 1993, Bisset, 1994, Apisariyakul *et al*., 1995; Roth *et al*., 1998, Miller et Murray, 1998; Young-Joon, 1999, White et Foster, 2000).

## III.2. Structure

La curcumine est une molécule symétrique, également connue sous le nom de diferuloyl méthane. Le nom IUPAC de curcumine est (1E, 6E) -1,7-bis (4-hydroxy-3-méthoxyphényl) -1,6-heptadiène-3,5-dione, de formule chimique $C_{21}H_{20}O_6$ et de poids moléculaire de 368,38. Elle a trois entités chimiques dans sa structure: deux systèmes cycliques aromatiques contenant des groupes phénoliques o-méthoxy, reliés par une chaine

à sept atomes de carbone consistant en un fragment β-dicétone α, β-insaturé (Priyadarsini, 2013) (Figure 8). Le groupe dicétone présente un tautomérisme céto-énol, qui peut exister dans différents types de conformères en fonction de l'environnement (Priyadarsini, 2009).

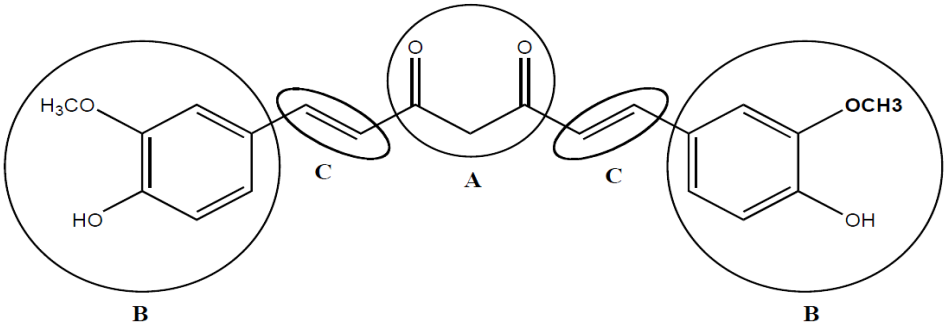



**Figure 8** : Régions de la curcumine 1. (A) b-dicétone ou céto-énol; (B) phénolique; (C) un lieur alcène.

En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre une forme énolique et une forme dicétonique (Figure 9). Dans des conditions acides et neutres, la forme dicétonique prédomine et la curcumine agit comme un puissant donneur de H atomes (Wang *et al*., 1997; Jovanovic *et al*., 1999). En revanche, dans des conditions alcalines (pH 8), la forme énolique de la chaîne heptadiénone prédomine, et la curcumine agit principalement comme un donneur d'électrons (Jovanovic *et al*., 1999).

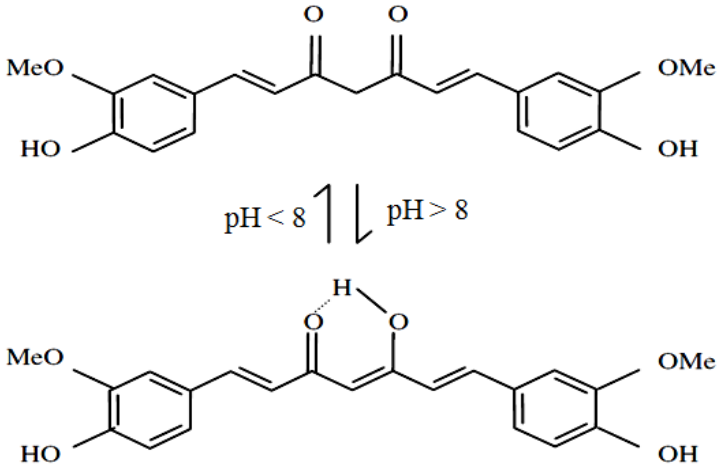



**Figure 9 :** Tautomérie céto-énolique de la curcumine dans différentes conditions physiologiques (Jovanovic *et al*., 1999).

### III.3. Propriétés physicochimiques

La curcumine est une molécule complexe constituée par des fonctions chimiques pouvant évoluer en fonction de l'environnement direct, de la présence de différents types de

solvants, de la température et de la présence de lumière. Cette complexité confère à la curcumine une large collection d'interactions possibles qui multiplient le nombre de cibles moléculaires potentielles. Les informations sur les propriétés physico-chimiques de la curcumine sont essentielles à l'interprétation et la compréhension de sa pharmacodynamique ou sa pharmacocinétique (Jourdan, 2015).

### III.3.1. Solubilité de la curcumine

La curcumine est un composé d'apparence hydrophile par la nature des substituants polaires sur les noyaux aromatiques, mais en réalité elle n'est pas soluble dans les solutions aqueuses et est au contraire facilement soluble dans les solvants organiques ce qui est confirmé par la mesure de son log P, qui reflète la différence de solubilité d'un composé entre deux solvants non-miscibles (Jourdan, 2015). Pour la curcumine le log P est ~3.0 (Priyadarsini, 2014), ce degré relativement élevé de lipophilie est dû à la conjugaison électronique qui s'étend d'un noyau aromatique à l'autre (Balasubramanian, 2006).

La curcumine est insoluble dans l'eau et l'éther mais soluble dans les solvants polaires comme le diméthylsulfoxyde (DMSO), le méthanol, l'éthanol, l'acétonitrile, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, etc. Elle est peu soluble dans les solvants hydrocarbonés comme le cyclohexane et l'hexane (Priyadarsini, 2014).

Une conséquence importante de cette lipophilie est que la chaîne centrale peut interagir avec des aminoacides hydrophobes dans des sites actifs de protéines (Liu *et al*., 2008). Le deuxième avantage de cette lipophilie est la capacité de la curcumine à interagir avec les biomembranes (Hung *et al*., 2008).

### III.3.2. Spectre d'absorption de la curcumine

Le spectre d'absorption de la curcumine a deux bandes d'absorption fortes, une dans la région visible avec un maximum allant de 410 à 430 nm et une autre bande dans la région UV avec un maximum à 265 nm. Le coefficient d'extinction molaire de la curcumine dans le méthanol est de 55.000 $dm^3 . mol^{-1} . cm^{-1}$ à 425 nm (Priyadarsini, 2014).

Le maximum d'absorption dans le méthanol en spectrophotométrie se situe à 430 nm et dans l'acétone à 415-420 nm (Aggarwal *et al*., 2003). Dans l'eau où la forme énolique est majoritaire sa λmax est de 430 nm. Par exemple, on lui trouve une λmax de 435 nm dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) sous la forme énolique alors que sa forme dicétone admet une λmax de 454 nm. Les variations de λmax et de ε sont dues à l'aptitude de la curcumine à

former des liaisons hydrogène inter-ou intra-moléculaires, en fonction du solvant (Bong, 2000).

### III.3.3. Stabilité de la curcumine

La stabilité d'une drogue est essentielle, à la conservation de son activité pharmacologique. La connaissance de cette stabilité aide les scientifiques à optimiser la formulation galénique nécessaire pour obtenir une biodisponibilité suffisante et limite la toxicité occasionnée par les produits de dégradation ou de métabolisme. (Jourdan, 2015).

La curcumine est stable à pH acide (estomac), mais pas à pH neutre ou alcalin. En conditions physiologiques, il existe un équilibre entre une forme énolique et une forme dicétonique (Figure 9). Cette propriété de la curcumine est responsable d'une large gamme d'activités biologiques (Cheikh Ali, 2012).

la curcumine est instable à pH basique, elle est dégradée en 30 min en trans-6-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-2,4- dioxo-5-hexanal, acide ferulique, féruloylméthane et en vanilline (Lin *et al*., 2000). Dans des conditions acides, la dégradation de la curcumine est beaucoup plus lente, avec moins de 20% du total de curcumine décomposée en 1 h. il a été constaté qu'elle est plus stable en culture cellulaire dans un milieu contenant 10% de sérum de veau foetal ou dans du sang humain, avec moins de 20% de décomposition en 1 h par rapport à 90% en 30 min dans un milieu sans sérum (Wang *et al*., 1997). La demi-vie de la curcumine en solution peut varier de quelques minutes à 6 h en fonction du pH, de la température et du milieu (Tonnesen *et al*., 2002).

La curcumine peut être dégradée par la lumière ou photo-oxydée car elle absorbe fortement dans les longueurs d'onde du domaine du visible. On peut observer cette photo-dégradation quelque soient son environnement chimique, ou son état cristallin ou solubilisé et ce, même en l'absence d'oxygène ou de lumière UV (Khurana et Ho, 1988). En raison de la sensibilité à la lumière, les échantillons contenant de la curcumine doivent être protégé de la lumière. Au-dessus du pH 7, la teinte de la curcumine est moindre jaune et plus rouge (Sharma *et al*., 2005).

## III.4. Pharmacocinétique et métabolisme

La faible biodisponibilité de la curcumine est bien documentée (Anand *et al*., 2007; Sharma *et al*., 2007). Les raisons majeures attribuées à cette biodisponibilité basse, sont une faible absorption digestive, un métabolisme rapide et une élimination systémique rapide (Anand *et al*., 2007), essentiellement dues à la nature hydrophobe de la curcumine (Aggarwal et Sung, 2009). Dans une première étude, une dose de 1 g / kg administrée dans

la nourriture de rats, il en résulte 75% de dérivés obtenus dans les féces et des quantités négligeables dans l'urine (Wahlstrom et Blennow, 1978). Quelques années plus tard, une étude de la curcumine orale administrée à des rats a démontré une absorption de 60% de la curcumine et a mis en évidence la présence de glucuroconjugués et de sulfates conjugués dans l'urine (Ravindranath et Chandrasekhara, 1980). Une fois absorbée, la curcumine va être très rapidement métabolisée, *via* des mécanismes de conjugaison, en glucuronoconjugué et en sulfate, ces modifications sont appelées réactions de phase 2. Le foie est l'organe principal dans lequel se déroulent ces réactions, dans le but de rendre la curcumine moins lipophile afin qu'elle soit éliminée plus rapidement. Le fait d'être métabolisé rapidement au niveau du foie est une étape subie par certaines substances absorbées par voie orale. On dit que la curcumine subit un fort « effet de premier passage hépatique » (Jourdan, 2015).

Chez l'homme, en raison de son renouvellement métabolique rapide dans le foie et la paroi intestinale, les concentrations sanguines de curcumine sont faibles et la distribution tissulaire est limitée après administration orale (Ringman *et al*., 2012). Les concentrations plasmatiques maximales de curcumine chez l'homme, même à la prise de doses aussi élevées que 10 ou 12 g de curcumine, restent dans la gamme nanomolaire basse (<160 nmol / L) (Vareed *et al*., 2008). Le pic des concentrations sériques apparaît au bout de 1 à 2 heures après l'administration orale de 8 g puis celles-ci diminuent progressivement dans les 12 heures qui suivent (Sharam *et al*., 2005).

L'administration intraveineuse (I.V) ou intra péritonéale (I.P) chez le rat donne de grandes quantités de curcumine ou de ses métabolites dans la bile, les métabolites étant surtout des tétrahydrocurcumine et d'hexahydrocurcumine. Par voie I.V., 50% de la dose se retrouve en moins de 5 h dans la bile (Sharma *et al*., 2007). Par voie I.P, ou systémique la réduction de la curcumine amène surtout à la formation de dérivés tétra-, hexa- et octahydrocurcumine (Aggarwal et Sung, 2009).

Un certain nombre de stratégies différentes pour augmenter la biodisponibilité de la curcumine a été également étudié. Les rôles des adjuvants, qui peuvent bloquer le métabolisme de curcumine, sont d'un grand intérêt, comme la pipérine, un alcaloïde naturel du poivre, est un inhibiteur de la glucuronidation de la curcumine dans le foie et l'intestin. L'étude menée par Shobha et ses collaborateur (1998) ont démontré que l'administration concomitante de la pipérine a entraîné une augmentation de la biodisponibilité de 150% chez le rat et de 2000% chez l'homme (Shoba *et al*., 1998). D'autres moyens d'améliorer la

biodisponibilité de la curcumine consistent à fabriquer de curcumine encapsulée dans des nanoparticules « nanocurcumine » (Bisht et *al*., 2007), des liposomes (Li et *al*., 2005), des micelles et des complexes de phoshoplipides (Maiti *et al*., 2007; Marczylo et *al*., 2007 ). Les avantages possibles attribués à de telles formulations sont les suivants: a) assurer une circulation plus longue; (b) augmenter la perméabilité cellulaire et (c) induire une résistance aux processus métaboliques (Aggarwal et Harikumar, 2009).

### III.5. Activités biologiques et propriétés pharmacologiques

Les très nombreuses publications parues ces dernières années sur les activités biologiques de la curcumine montrent à quel point elles sont diverses, touchant de nombreux aspects des processus cellulaires (Sharam *et al*., 2005), dont les plus importants on cite :

#### III.5.1. Effet anti-inflammatoire

La curcumine est utilisée depuis l'antiquité pour le traitement de certaines maladies inflammatoires. Du fait qu'elle est une molécule très pléiotrope capable d'interagir avec de nombreuses cibles moléculaires impliquées dans l'inflammation. La curcumine module la réponse inflammatoire via la régulation négative « down-regulating » de l'activité de la cyclooxygénase-2 (COX-2), lipoxygénase (LOX) et l'enzyme inductible de synthèse de l'oxyde nitrique (iNOS), inhibe la production du cytokines inflammatoires; nécrose tumorale factorale (TNF-α), interleukines (IL) -1, -2, -6, -8 et - 12, (Goel *et al*., 2008 ; Abe *et al*., 1999). L'inhibition de tous ces cibles est probable accompli par la suppression de l'activation du facteur nucléaire kappaB (NF-*κ*B) par la curcumine (Surh *et al*. 2001). Le NF-*k*B, facteur nucléaire contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans nombreux processus cellulaires (prolifération cellulaire, apoptose, réponse inflammatoire ou auto-immune, tumorigenèse). En effet, de nombreuses études, sur différents types cellulaires, montrent que la curcumine inhibe la voie NF*k*B, en inhibant l'activité du complexe IKKs (I*k*B kinases) responsable de la phosphorylation de I*k*B. I*k*B n'étant plus phosphorylé, il reste associé à NF*k*B, empêchant ainsi la translocation de ce dernier dans le noyau, ce qui traduit par la diminution de l'expression de COX-2 et iNOS, et même des cytokines (Jobin *et al*., 1999 ; Surh *et al*. 2001, Shishodia *et al*., 2003, Siwak *et al*., 2005), Mais la curcumine inhibe également d'autres facteurs de transcription comme AP-1 (Activator Protein 1), un facteur essentiel de la prolifération cellulaire, Egr-1 (early growth response 1), un effecteur très précoce de la cascade de différenciation cellulaire (Aggarwal *et al*., 2003 ; Woo *et al*., 2005), et STAT 3, un autre facteur de transcription à travers lequel le cytokine pro-inflammatoire IL-6 médie ses effets (Bharti *et al*., 2003). Elle

interfère aussi avec d'autres voies de transduction intracellulaire contrôlant entre autre l'inflammation, l'apoptose ou l'oncogenèse, et, notamment, elle inhibe l'activité des mitogen- activated protein kinases (MAPKinases) dont la c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Chen *et* Tan, 1998) et d'autres kinases dont la protéine kinase C (PKC) (Aggarwal *et al*., 2003 ; Woo *et al*., 2005), elle inhibe également la protéine chimioattractive des monocytes (MCP) (Goel *et al*., 2008). L'influence de la curcumine sur toutes ces cibles moléculaires explique en partie son effet favorable sur l'inflammation et même sur la carcinogenèse.

**III.5.2. Effet antioxydant**

La curcumine est classée comme un excellent antioxydant, 10 fois plus forte que la vitamine E (Khopde *et al*., 1999), agit par différents mécanismes, *In vitro*, la curcumine peut inhiber significativement la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO), comme l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, ainsi que la génération des radicaux nitrite, elle peut aussi diminuer la production d'ERO *in vivo* (Gupta et *al*., 2011). Aussi, la curcumine agit comme piégeur des radicaux libres, notamment l'anion superoxyde et l'hydroxyle et induisant un effet protecteur contre les dommages radicalaires des lipides et de l'ADN, ces altérations jouent un rôle important dans les phénomènes de carcinogenèse et d'athérosclérose (Barik *et al*., 2005). Il a été également montré que la curcumine pouvait réguler et inhiber l'activité de la NOS inductible (iNOS), enzyme produisant le monoxyde d'azote (NO) un agent pro-inflammatoire très actif (Camacho-barquerol *et al*., 2007) et joue, entre autres, un rôle dans la carcinogenèse (Chan *et al*., 1998). La curcumine diminue également la péroxydation lipidique en maintenant l'activité d'enzymes antioxydantes telles que la superoxyde-dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase (Khopde et *al*., 1999). La curcumine est un bon chélateur de métaux dont le pouvoir potentiellement dangereux (Jayaprakasha *et al*., 2005). Le mécanisme d'action antioxydant de la curcumine est attribué à sa structure conjuguée unique, le groupe méthoxy pourrait jouer un rôle majeur. Le système des composés phénoliques et le groupe méthoxy sur le noyau phényl et le 1,3-dicétone sont des caractéristiques structurelles qui peuvent participer à ces effets (Araujoc et Leonl, 2001).

**III.5.3. Effet anticancéreux**

La curcumine possède un pouvoir cytotoxique et une capacité à induire l'apoptose dans différentes lignées cellulaires cancéreuses, elle est considérée ainsi comme un agent anticancéreux potentiellement intéressant. Au niveau cellulaire, la curcumine inhibe la prolifération et arrête le cycle des cellules issues de différentes tumeurs dont celles du

côlon, du rein, de la prostate, du sein, de mélanomes, d'origine lymphoïde, myéloïde, ou épithélial. Ses effets peuvent être expliqués par plusieurs mécanismes : la curcumine inhibe l'expression des cyclines D1 via la stimulation de PPAR γ (proliferatoractivated- receptor-γ), joue sur le métabolisme des polyamines en inhibant l'induction de l'ornithine décarboxylase (ODC), inhibe l'expression de la COX-2, elle induit l'apoptose en inhibant l'expression de Bcl-2 et Bcl-xl et en augmentant la stabilité de p53, la génération d'ERO, la libération du cytochrome C et l'activation de caspases. L'effet de la curcumine sur les voies NF-$_k$B, Akt/ PKB, AP-1 ou JNK a été également avancée pour expliquer ses effets antitumoraux. Il a été montré que la curcumine est un bon agent chimiopréventif des cancers (Anto *et al*., 1996 ; Aggarwal et *al*., 2003 ; Sharam et *al*., 2005), elle inhibe l'initiation et la phase de promotion du processus de carcinogenèse, notamment dans des modèles de cancers du côlon ou de la peau (Chan et *al*., 1998).

### III.5.4. Effet antimicrobien

La curcumine inhibe la croissance de variétés de microorganismes tels que les virus, bactéries et certains champignons pathogènes. Le curcuma agit comme un agent antiviral contre le Virus de l'Immunodéficience Humaine, elle inhibe l'activation de la répétition terminale (LTR), qui est la partie essentielle de système commun dans le VIH et diminue ainsi la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (Chai et Yan lin, 2005).

## IV. Toxicité de la Curcumine

La curcumine est déclaré par la FDA (Food and Drug Administration américaine) sur le registre des "*G.R.A.S.*" (Generally Recognized As Safe), ce qui autorise aussi son utilisation a une dose journalière admissible (*DJA*) de 0,1 à 3 mg / kg de poids corporel par le Comité mixte FAO / OMS d'experts des additifs alimentaires, 1996 (Nci, 1996). Bien que la curcumine ait montré une grande variété d'effets pharmacologiques et considérée qu'elle n'est pas toxique soit chez les animaux (Shankar *et al*., 1980), ou chez l'humain (Soni et Kuttan,1992), il existe plusieurs études concernant sa toxicité.

Le Programme National de Toxicologie (NTP) américain, a évalué la toxicité à court et à long terme de la curcumine avec différentes doses quotidiennes (50, 250, 480, 1300 ou 2600 mg / kg de poids vif) pour une période de 13 semaines ou 2 ans chez des rats et des souris. Pour les deux périodes d'études aucun décès lié au curcumine n'a été constaté. Pour l'étude de 13 semaines, seulement une augmentation du poids du foie, des taches du pelage, face décolorée et une hyperplasie de l'épithélium muqueux dans le caecum et du côlon des rats qui ont reçu la dose 2600 mg / kg ont été notés comme la seule toxicité

relative. Aucune lésion carcinogène n'a été observée. Pour l'étude de 2 ans, pas d'effet sur la prise alimentaire par rapport au groupe placebo, Dans le groupe à 2600 mg/Kg, les rats ont pu développer des ulcères, une inflammation chronique active, une hyperplasie du caecum, un adénome hépatocellulaire et un carcinome intestinal (Noorafshan et Ashkani-Esfahani, 2013). D'autres études chez des rats confirment l'absence de toxicité, des doses allant jusqu'à 5 g / kg n'ont pas eu d'effets néfastes, de même avec des doses de 3.5 g / kg données pendant 3 mois, dans les études précliniques d'innocuité systématique commandées par l'Institut National du Cancer Américain (NCI) chez le rat, le chien, le singe (Sharma *et al*., 2005). La dose létale médiane ($DL_{50}$) de la curcumine pour une ingestion orale chez la souris est supérieure à 2,0 g / kg (Itokawa *et al*. 2008).

Similaire aux conclusions concernant la sécurité de la curcumine dans les modèles précliniques, les essais cliniques ont documenté un minimum toxicité due à l'administration de curcumine ou de curcuma, Dans une étude réalisée en Inde, l'administration de 1,2 à 2,1 g de curcumine orale aux patients atteints de polyarthrite rhumatoïde quotidiennement pendant 2 à 6 semaines n'a provoqué aucune toxicité (Deodhar *et al*., 1980). Dans une autre étude par Cheng et ses collègues (2001) à Taïwan, sur l'administration orale de la curcumine à haute dose, jusqu'à 8 g par jour pendant 3 mois aux patients à haut risque de cancer ou présentant déjà des lésions précancéreuses n'ont eu aucun effet indésirable (Cheng *et al*, 2001).

De même, en terme d'alimentation utilisée dans différents pays, selon une étude du Népal, la consommation alimentaire de curcuma jusqu'à 1,5 g par personne et par jour, équivalent à 50 mg / jour de curcumine, ne semble pas être associé avec des effets néfastes chez l'homme (Eigner et Scholz, 1999). En Inde, où l'apport moyen de curcuma peut atteindre 2,0 à 2,5 g par jour (correspondant à 60-100 mg de curcumine par jour), aucune toxicité ou des effets indésirables ont été signalés au niveau de cette population (Chainani, 2003).

L'étude de Vareed et ses colaborateur (2008) concernait des volontaires en bonne santé qui ont administrés une dose orale unique de curcumine formulée en capsules (10 ou 12 g), afin de suivre la pharmacocinétique de la curcumine. Le nombre de capsules à ingérer était important, 40 capsules pour la dose de 10 g et 48 pour la dose de 12 g, les auteurs ont déclaré qu'il y a eu quelques effets secondaires qualifiés de non graves puisqu'ils correspondent au grade 1 de la classification OMS des grades de toxicité. La curcumine présente une bonne sécurité d'emploi, et l'innocuité observée dans cette étude est comparable à l'ensemble des données disponibles (Vareed *et al*., 2008)

# *Matériel et Méthodes*

# I. Matériel

## I.1. Animaux

Cette étude a été réalisée sur des rats *Albinos Wistar* femelles pesant 200 ± 14,53 g, issus de l'Institut Pasteur d'Algérie. Ils sont stabulés au niveau de l'animalerie du Bloc des laboratoires de Recherche des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Sétif, dans laquelle la température était dans l'intervalle de 20-24°C et l'humidité relative entre 60-70%, avec un cycle lumière/obscurité de 12/12 h. Les rats sont placés par groupes dans des cages en plastiques, avec accès à une nourriture standardisée fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) de Bejaia, et de l'eau *ad libitum*. Les expérimentations débutent après une période d'adaptation d'une durée de 15 jours.

## I.2. Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont de grade analytique et proviennent de Sigma Aldrich, Fluka et prolabo, Ils comprenent le (E,E)-1,7-bis(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione (Curcumine), le 2,6-Di-*tert*-butyl-α-(3,5-di-*tert*-butyl-4-oxo-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)-*p*-tolyloxy (GOR)**,** le 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT), le 2(3)-t-Butyl-4-hydroxyanisole (BHA), 2,2′-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), le ferricyanide de potassium [$K_3Fe(CN)_6$], l'acide trichloroacétique (TCA), le trichlorure de fer ($FeCl_3$), le peroxyde d'hydrogène ($H_2O_2$), le sulfate ferreux (FeSO4), le sodium salicylate, Le chlorure de cuivre(II) ($CuCl_2$), Néocuproine, l'acétate d'ammonium $NH_4Ac$, la xanthine oxydase, la xanthine, collagène-II, l'adjuvant complet de Freund (ACF), l'adjuvant incomplet de Freund (AIF), Carboxymethyl Cellulose de sodium (Na-CMC*)* , l'acide thiobarbiturique (TBA), l'acide 5, 5- dithiobis 2- nitrobenzoique (DTNB), l'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) et le pyrogallol.

# II. Méthodes

Dans cette étude on a estimé l'effet de la curcumine sur le stress oxydant et l'inflammation dans le cas de l'arthrite rhumatoïde induite chez les rats. L'étude *in vivo* a été précédée par une évaluation préliminaire de la curcumine, *in vitro*, de l'effet anti-oxydant, anti-inflammatoire et inhibiteur de la XO, après quoi nous avons procédé à l'étude *in vivo* sur des rats atteints d'une arthritique expérimentale induite par le collagène II (CIA).

## II.1. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

### II.1.1. Effet scavenger du radical Galvinoxyle (GOR)

Le galvinoxyl est un radical libre stable comme le radical DPPH, il est utilisé pour déterminer l'activité anti-oxydante d'un composé et notamment anti-radicalaire des différentes molécules. Ce test est basé sur le pouvoir des composés anti-oxydants à neutraliser ou à réduire le radical galvinoxyl de couleur initialement jaune qui absorbe à 428 nm, à un composé réduit décoloré qui n'absorbe plus à cette longueur d'onde, ce qui traduit par une diminution de l'absorbance (Imai *et al.*, 2019). L'effet scavenger du radical Galvinoxyle a été évalué selon la méthode décrite par Shi et ses collaborateurs (2001). Brièvement, 160 µl d'une solution méthanolique de Galvinoxyl (0.1 mM) a été ajouté à 40 µl des différentes concentrations (1.56 - 50 µg /ml) de curcumine ou des standards (BHT et BHA), dans des puits de microplaque à 96 puits. Après 120 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, L'absorbance a été ensuite mesurée à 428 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque à 96 puits.

L'activité anti-radicalaire est exprimée par le pourcentage d'inhibition du radical galvinoxyl en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

$A_C$: Absorbance de contrôle en absence de l'échantillon

$A_E$: Absorbance en présence de l'échantillon (Curcumine, BHT, et BHA)

### II.1.2. Réduction du radical-cation $ABTS^{+\bullet}$

L'$ABTS^{\cdot+}$ est un radical cationique de couleur bleue-verte, ce radical est généré en réagissant avec le persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis 3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique). L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et le transforme en $ABTS^{+}$ incolore. Cette décoloration mesurée par spectrophotométrie à 734 nm reflète la capacité de capture du radical libre (Walker *et al*., 2009).

L'analyse spectrophotométrique de l'effet scavenger du radical-cation $ABTS^{\cdot+}$ a été déterminée selon la méthode de Re et ses collaborateurs (1999). Ce radical est formé par le mélange de 10 mL de la solution d'ABTS (7 mM) avec 10 mL de la solution de $K_2S_2O_8$ (2.45 mM). Après 16 h d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, et avant l'utilisation, la solution d'$ABTS^{\cdot+}$ obtenu a été diluée jusqu'à obtenir une absorbance de 0.70 ± 0.02 à 734 nm. Dans une microplaque à 96 puits, 160 µL de la solution d'$ABTS^{\cdot+}$ diluée ont été mélangée avec 40 µl de différentes concentrations de la curcumine ou des

standards (BHT, BHA et Vit C). Le mélange est incubé à l'obscurité pendant 10 min, l'absorbance est mesuré ensuite à 734 nm. Le pourcentage de l'effet scavenger du radical $ABTS^{\cdot+}$ est calculé selon l'équation suivante:

$$\% \text{ d'effet scavenger d'ABTS}^{\cdot+} = [(A_C - A_E) / A_C] \times 100$$

$A_C$: Absorbance de la solution d'$ABTS^{\cdot+}$en absence d'échantillon

$A_E$: Absorbance de la solution d'$ABTS^{\cdot+}$ en présence d'échantillon

### II.1.3. Effet piégeur du radical Hydroxyle ($OH^{\bullet}$)

Le principe de ce test est basé sur la génération du radical $OH^{\bullet}$ dans le milieu réactionnel via la réaction de fenton par réaction entre le sulfate ferreux (FeSO4) et le peroxyde d'hydrogène, pour détecter ce radical le sodium salicylate est ajouté au milieu, le radical hydroxyle ainsi produit réagit avec le sodium salicylate pour fournir le complexe hydroxyle salicylate de couleur rose, la présence des substances capables de piéger le radical OH• empêche ce dernier à réagir avec le sodium salicylate ce qui se traduit par un changement de la couleur qui peut être suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 510 nm.

L'estimation de l'effet piégeur du radical hydroxyle par la curcumine a été effectuée selon les procédures décrites par Smirnoff et Cumbes (1989). Brièvement, 24 µl de $FeSO_4$ (8 mM) ajouté à 20 µl de $H_2O_2$ (20 mM), 80 µl d'acide salicylique (3 mM) et 40 µl de différentes concentrations de la curcumine ou de l'acide ascorbique comme standard (6.25 à 200 µg/ml) dans une microplaque à 96 puits. Après 30 min d'incubation à 37°C à l'obscurité, 30 µl d'$H_2O$ sont additionnés. L'absorbance du complexe hydroxyle salicylate est mesurée ensuite à 510 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical hydroxyle est calculé comme suit :

$$\% \text{ d'Inhibition} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

$A_0$: Absorbance du control (sans curcumine ou standard).

$A_1$: Absorbance avec curcumine ou standard.

$A_2$: Absorbance sans sodium salicylate.

### II.1.4. Pouvoir réducteur

Le test du potentiel réducteur est souvent employé comme indicateur de capacité de donner des électrons, qui est un mécanisme important pour examiner l'action antioxydante des composés polyphénoliques. Dans ce test, la présence d'un réducteur (antioxydant), va

réduit le complexe $Fe^{3+}$/ferricyanide [$FeCl_3/K_3Fe(CN)_6$] à la forme ferreuse ($Fe^{2+}$), s'accompagne par le passage de la couleur jaune à la couleur vert bleuâtre, qui absorbe à la longueur d'onde 700 nm, la couleur intense signifie un puissant effet réducteur (Oliveira *et al.*, 2008).

Le pouvoir réducteur de la curcumine est déterminé par la méthode d'Oyaizu (1986) avec une légère modification. 10 µl de différentes concentrations de curcumine ou de standards a été mélangé avec 40 µL du tampons phosphate (0.2 M, pH=6.6) et 50 µL de potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] (1%) dans une microplaque à 96 puits. Après 20 min d'incubation du mélange à 50°C, le mélange réactionnel est acidifié avec 50 µl d'acide trichloracétique (10%) afin d'arrêter la réaction. Finalement, 40 µl d'eau distillé et 10 µl de $FeCl_3$ (0.1%) a été ajouté. L'absorbance est mesuré à 700 nm en utilisant un lecteur de microplaque.

L'absorbance la plus élevée indique le pouvoir réducteur le plus élevé, et ce dernier est exprimé par la valeur d'$A_{0.5}$ qui signifié la concentration qui donne une absorbance de 0.5, cette valeur a été obtenu par régression linéaire (Nile et Park, 2014).

### II.1.5. Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe Cu (II)-Néocuproïne de couleur bleu claire. En effet, en présence d'un agent antioxydant, ce complexe est réduit en Cu (I)-Néocuproïne de couleur jaune orangé, cette réaction est quantifiée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm (Tütem *et al.*, 1991).

La capacité antioxydante par réduction de cuivre est testée par la méthode d'Apak et ses collaborateus (2004) avec légère modification. Dans une microplaque à 96 puits, 50 µl de $CuCl_2$ (10 mM), 50 µl de néocuproine (7.5 mM), et 60 µl de $NH_4Ac$ (1 M, pH 7.0) ont été ajoutées à 40 µl de différentes concentrations de la curcumine ou de Standards. Après 1h d'incubation, l'absorbance a été mesuré à 450 nm contre un blanc en utilisant un lecteur de microplaques. Les résultats ont été donnés comme absorbance et comparés avec ceux de BHA et BHA utilisés comme antioxydants standards.

La capacité de réduction est exprimé par la valeur d'$A_{0.5}$ qui signifié la concentration qui indique une absorbance de 0.5, cette valeur a été obtenu par régression linéaire.

### II.1.6. Test de Phenanthroline

Cette méthode est basée sur la réduction de $Fe^{3+}$ en $Fe^{2+}$ par un antioxydant. Le $Fe^{2+}$ ainsi formé réagit avec la 1,10-phénanthroline pour former le complexe de ferroïne de couleur rouge orange (Yefrida *et al* ., 2018). La concentration de ce complexe est déterminée à 510 nm, la couleur intense signifie un puissant effet réducteur.

Le mélange réactionnel contient de 30 µL O-phenanthroline (0.5%), 50 µL $FeCl_3$ (0.2%), 110 µL Méthanol, et 10 µL de différentes concentrations de la curcumine. Le mélange est incubé pendant 20 min à 30°C, et l'absorbance a été mesuré à 510 nm (Szydlowska-Czerniaka *et al*., 2008).

### II.1.7. Chélation de fer ferreux

Dans ce test, le ferene peut former avec le $Fe^{2+}$ libre présent dans un milieu réactionnel un complexe $Fe^{2+}$-ferene coloré en bleu, ce dernier peut être quantifié par spectrophotométrie à 593 nm. En effet, la chélation de fer par un agent chélateur diminue la formation du complexe $Fe^{2+}$-ferene et donc diminue l'absorbance, ce qui reflète la capacité des antioxydants à chélater le Fer (Artiss *et al*., 1981). Plus la coloration de la solution contenant la substance testée est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

La chélation des ions ferreux par la curcumine est mesuré en suivant la méthode de Decker et Welch (1990). 40 µL de différentes concentrations de curcumine est ajoutée à 40 µL de méthanol et 40 µL de $FeCl_2$ (0.2 mM). Après une agitation vigoureuse, la réaction est initialisée par l'addition de 80 µL de ferene (0.5 mM). Après une deuxième agitation vigoureuse, le mélange obtenu est incubé pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 593 nm contre un blanc contenant tous les réactifs à l'exception de la ferene. Une absorption plus faible indique un pouvoir de chélation plus élevé. L'EDTA est utilisé comme un chélateur de référence. L'effet de la chélation des ions de fer est évalué par l'équation suivante :

$$\% \text{ Chélation de } Fe^{2+} = [(A_E - A_C)/A_C] * 100$$

$\mathbf{A_C}$: Absorbance de contrôle en absence de l'échantillon

$\mathbf{A_E}$: Absorbance en présence de l'échantillon (Curcumine ou EDTA)

### II.2. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire de la curcumine a été évaluée par la technique d'inhibition de la dénaturation de l'albumine de sérum bovin (ASB) selon Kandikattu et ses collaborateurs (2013) avec certain modifications. Brièvement, 1 ml de solution d'ASB (0.2 %) est ajouté

à 1ml de différentes concentrations de curcumine (62.5- 2000 µg/ml). Le mélange est ensuite incubé à 37 °C dans un bain marie durant 15 min puis à 70°C durant 5 min. Après refroidissement, la turbidité a été mesurée à 660 nm contre un blanc. Le voltarène est utilisé comme standard. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = [Abs_{\text{contrôle}} - Abs_{\text{Echantillon}} / Abs_{\text{contrôle}}] \times 100$$

### II.3. Inhibition de la xanthine oxydase (XO)

La xanthine oxydase transforme la xanthine en acide urique. L'inhibition de cet enzyme conduit à une diminution de la production d'acide urique. L'effet inhibiteur de la curcumine vis-à-vis de l'activité de la XO a été estimé par spectrophotomètre en suivant la production de l'acide urique à 290 nm, selon le protocole d'Oskoueian et ses collaborateurs (2011). Brièvement, 300 µl de la xanthine (0.15 mM, pH 7.5) sont ajoutés à 635 µl de tampon potassium phosphate (50 mM, pH 7.5), 33 µl de différentes concentrations de la curcumine et 33 µl de xanthine oxydase (0.07 U/ml). La production de l'acide urique est suivie en mesurant la variation de l'absorbance pendant 1 min contre un blanc qui contient tous les réactifs à l'exception de l'inhibiteur qui est remplacé par le méthanol. L'allopurinol, l'inhibiteur spécifique de la XO a été utilisé comme standard.

L'activité inhibitrice est exprimée en pourcentage d'inhibition (% I) et calculé ainsi :

$$\% \text{ d'Inhibition} = [(\Delta A_C - \Delta A_E) / \Delta A_C] \times 100$$

$\Delta A_C$ : Différence de l'absorbance en absence de l'inhibiteur (contrôle négatif)

$\Delta A_E$ : Différence de l'absorbance en présence de l'inhibiteur

### II.4. Effet de la curcumine sur l'arthrite rhumatoïde induite par le collagène-II (CIA) chez les rats

#### II.4.1. Induction de l'arthrite rhumatoïde

L'ensemble des rats *Albinos Wistar* femelles utilisés sont divisés en cinq groupes de poids homogènes, de 10 rats dans chaque groupe. L'arthrite a été induite chez tous les groupes sauf le groupe contrôle normal, selon la méthode de Tong *et al*. (2016) avec certaines modifications. Brièvement, du collagène de Type II (CII) purifié par notre collègue Derradji Yacine, Enseignant-Chercheur à Université Mohammed Khider, Biskra, Algérie, a été solubilisé (6 mg/mL) dans une solution d'acide acétique 0.1M à 4°C pendant une nuit.

Pour la première immunisation, cette solution a été émulsifiée avec le même volume d'adjuvant complet de Freund (ACF), la concentration finale de la solution de CII émulsifiée était de 3 mg/ml. Après anesthésie, les rats des quatre groupes ont reçu une injection intradermique de 200 µl d'émulsion sur le bas du dos rasé en quatre points. Après une semaine, un second rappel d'immunisation a été effectué avec 100 µl de solution de CII (6 mg/ml) émulsifiées avec le même volume de l'adjuvant incomplet de Freund (AIF) et qu'elle a été injectée de la même façon à deux points sur le dos et à la base de la queue.

### II.4.2. Traitement préventif et curatif par la curcumine

Pour évaluer l'effet préventif et curatif da la curcumine sur les rats injectés par le collagène II, le traitement des différents groupes est effectué de la façon suivante :

- **Contrôle**: Contrôle normal, des rats sains qui ne sont pas induits avec le CIA et gavé avec le Na-CMC (1%), utilisé comme véhicule, dés le **1$^{er}$ jour** de l'étude.
- **CIA**: Contrôle Négatif, des rats induits avec le CIA, non traités, et gavé avec Na-CMC (1%), dés le **1$^{er}$ jour** de l'étude jusqu'au 40$^{éme}$ jour.
- **CIA+Indo**: Control positive, des rats induits avec le CIA, et gavé avec un traitement de référence, l'indométacine, suspendu dans le Na-CMC (1%), 3 mg/kg/jour, dés le **1$^{er}$ jour** de l'étude jusqu'au 40$^{éme}$.
- **CIA+Cur$^{P}$**: Traitement préventif de la Curcumine, des rats induits avec le CIA, et gavé avec un traitement de curcumine 110 mg/kg/jour, suspendu dans le Na-CMC (1%), dés le **1$^{er}$ jour** jusqu'au 40$^{éme}$ jour de l'étude.
- **CIA+Cur$^{C}$**: Traitement curatif de la Curcumine, des rats induits avec le CIA, et gavé avec un traitement de curcumine 110 mg/kg/jour, dés le **14$^{éme}$ jour** jusqu'au 40$^{éme}$ jour de l'étude.

### II.4.3. Evaluation des paramètres cliniques de l'arthrite

Le poids corporel, l'épaisseur des paumes et des plantes des pattes à l'aide d'un pied à coulisse digital, et la sévérité arthritique (score arthritique) ont été mesurés chaque 3 jours dés le 1$^{er}$ jour de l'immunisation jusqu' au 40$^{éme}$ jour de l'étude.

Le score pour chaque patte a été évalué comme suit (Schett *et al*., 2000) :

0 : Normal, pas de gonflement ni rougeur des pattes; aucun changement.

1 : rougeur et/ou gonflement dans un seul type d'articulation

2 : rougeur et/ou gonflement dans 2 types d'articulation

3 : rougeur et/ou gonflement dans 3 types d'articulation

4 : rougeur et/ou gonflement dans 4 types d'articulation, y compris la patte entière, entraînant une ankylose et une perte de mobilité articulaire.

Cette évaluation a été effectuée sur les articulations interphalangiennes (distale et proximale), métacarpophalangiennes /métatarsophalangiennes, et sur les articulations du poignet et de la cheville pour les pattes antérieures et postérieures, respectivement. Le score arthritique total pour un rat est la somme des scores des quatre pattes, avec un score maximal de 4 pour chaque patte et de 16 pour chaque rat.

### II.4.4. Prélèvement du sang et des organes

Après 40 jours tous les rats ont été anesthésiés sous l'inhalation de chloroforme et ont été euthanasiés par décapitation. Le sang est recueilli dans des tubes qui contiennent l'EDTA afin d'utiliser pour la détermination de la formule de numération sanguine (FNS). Après dissection, le foie et les reins ont été prélevés, bien nettoyés avec de l'eau physiologique, dégraissés et séchés. Une partie de ces organes est conservée au congélateur pour le dosage des paramètres du stress oxydant et de la XO. Les quatre pattes ont été également disséquées et fixées dans du formol (10%), pour une étude radiopathologique et histopathologique.

### II.4.5. La numération formule sanguine

La numération-formule sanguine (FNS) ou hémogramme est effectué immédiatement sur le sang recueillie au niveau du laboratoire de Biochimie, du CAC-Sétif, Algérie, à l'aide d'un automate. Cet analyse permet de numéroté les différentes cellules sanguines comprenant les globules rouges (hématies) et les globules blancs (leucocytes), ainsi permet de quantifier l'hémoglobine.

### II.4.6. Examen radiologique

Les pattes prélevées ont fait l'objet d'un examen radiologique au niveau du centre d'imagerie médicale EL YASMINE à Bordj Bou Arreridj, à l'aide d'une machine à rayons X (Primax modèle type RTM 782H, Italie). Les paramètres des radios étaient de 46,0 kv et 3,00 mAS. Le score a ensuite été estimé sur les images digitalisées et aux radiographies originales comme suit: score 0, normal, pas de gonflement de tissu ou dommages osseux; score 1, gonflement de tissu et œdème; score 2, érosion d'articulation; score 3, érosion d'os et formation ostéophyte (Cuzzocrea *et al*., 2001). Le score radiologique total est la somme de score des deux pattes supérieures, avec un score maximal de 6 pour chaque rat (Cuzzocrea *et al*., 2001).

### II.4.7. Examen histopathologiques

Avant l'examen histologique, la matrice osseuse des pattes fixées dans le formol a été décalcifiée avec une solution d'acide formique (5%) (Villanueva *et al*., 1986). Après la décalcification, les échantillons ont été transportés au service de l'anatomie pathologique du CHU- Sétif pour l'examen histopathologique. L'étude est effectuée selon le protocole expérimental du laboratoire, en premier temps les pattes sont déshydratées par passage dans des bains successifs d'éthanol de 30 min (70°, 90° et 100°C), ensuite ils sont éclaircis dans deux bains de toluène de 20 min puis inclus dans deux autres bains de paraffine pendant 2 heures. L'inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules métalliques. Après refroidissement, les blocs obtenus sont coupés par microtome à des coupes de 5 µm d'épaisseur, ces dernières sont placées sur des lames de verre préalablement recouvertes de gélatine à 2% puis séchées dans une étuve, déparaffinées dans du xylène, et réhydratées dans des bains successifs d'éthanol. Après rinçage avec de l'eau distillée, les coupes sont colorées avec la combinaison entre deux colorants hématoxyline et éosine (H&E). Les lames ainsi colorées sont couvertes de lamelles et sont alors prêtes à l'observation au microscope.

Les scores histopathologiques ont été évalués sur les articulations de la cheville des deux pattes inferieures en fonction de l'infiltration cellulaire, formation de pannus, l'hyperplasie synoviale et de l'érosion de l'os et de cartilage, en suivant l'échelle suivante : 0 (pas de changement), 1 (changement minime de 1 à 25 %), 2 (changement moyen de 26 à 75%), et 3 (changement sévère de 76 à 100%) (Tong *et al*., 2016).

### II.4.8. Préparation de l'homogénat

L'homogénat de tissu du foie et des reins est préparé par l'homogénéisation de 500 mg de tissu avec 4.5 ml du tampon KCL (0.15 M) à 4°C à l'aide d'un homogénéiseur. Le mélange obtenu est ensuite centrifugé à 3000 rpm durant 10 min à 4°C (Zuo *et al*., 2014). Le surnageant est aliquoté puis conservé à -20°C pour l'estimation des paramètres du stress oxydatif et de l'activité de la XO.

### II.4.9. Dosage des marqueurs du stress oxydant

Les marqueurs du stress oxydatif ont été estimés dans l'homogénat du foie et des reins. Il s'agit du malondialdéhyde (MDA), le glutathion réduit (GSH), la catalase (CAT), et la superoxyde dismutase (SOD).

### II.4.9.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est le major produit de la réaction de dégradation des lipides polyinsaturés il est utilisé souvent comme un biomarqueur de la peroxydation lipidique. Il réagit avec deux molécules de TBA et forme ainsi un complexe coloré en rose qui peut être mesuré par spectrophotomètre à 532 nm. Une augmentation de génération du MDA dans les organes en conséquence du stress oxydant, traduit par une augmentation de la formation du complexe (Mihara *et al*., 1978 ; Uzma *et al*., 2014). Pour Le dosage du malondialdéhyde (MDA) dans l'homogénat du foie et des reins, 125 µl d'homogénat sont ajoutés à un mélange de 125 µl d'acide trichloracétique (20%) et 250 µl d'acide thiobarbiturique (TBA à 0.67 %). Le mélange est chauffé à 100 °C pendant 15 minutes. Après refroidissement,1 ml du n-butanol est ajouté puis suivi par une centrifugation à 3000 rpm pendant 15 minutes (Okhawa *et al*., 1979). L'absorbance est mesurée à 532 nm. La quantité du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire 1.56 x $10^5$ $M^{-1}$ $cm^{-1}$ et les valeurs sont exprimées en nanomole de MDA formé par gramme du tissu.

### II.4.9.2. Dosage du Glutathion réduit (GSH)

Le taux du GSH est obtenu par la méthode colorimétrique d'Ellman, (1959). Cette dernière est basée sur le fractionnement de la molécule d'acide 5,5′ dithiodis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par le groupe sulfhydryl (-SH) du glutathion, ce qui libère un composé jaune, l'acide thionitrobenzoique (TNB) lequel, à pH alcalin (8-9), présente une absorbance à 412 nm. Brièvement, 25 µl d'homogénat sont dilués dans 5 ml du tampon phosphate (0.1 M, pH 8). Puis, 3 ml de la solution de l'homogénat dilué sont mélangés avec 20 µl de DTNB (0.01 M). Le mélange est incubé à une température ambiante pendant 5 min. Puis l'absorbance est lue à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions mais sans homogénat. La concentration du GSH est déterminée en utilisant le coefficient d'extinction molaire 14150 $M^{-1}$ $cm^{-1}$ et les valeurs sont exprimées en µmol/mg de protéine dans l'homogénat.

### II.4.9.3. Estimation de l'activité de la catalase (CAT)

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$ en $H_2O$ et $O_2$. Le peroxyde d'hydrogène absorbe à 240 nm, la présence de cette enzyme conduit à la diminution de l'absorbance du $H_2O_2$ à 240 nm, l'activité enzymatique est ainsi estimée en suivant la différence de l'absorbance à la même longueur d'onde (Aebi, 1984).
A 983.5 µL de $H_2O_2$ (0.019 M), préparées dans le tampon $KHPO_4$ (0.1 M, pH 7.2), 16.5µL de l'homogénat sont ajoutés. La variation de l'absorbance est suivie pendant 30 s à 240

nm. L'activité enzymatique en µmol du $H_2O_2$ /min/mg de protéine au niveau tissulaire est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire 43.6 $M^{-1}cm^{-1}$.

### II.4.9.4. Estimation de l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase (SOD) est une métallo-enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en $H_2O_2$ et $O_2$. Son activité peut être estimée avec le pyrogallol. L'auto-oxydation du pyrogallol est stable à pH acide mais elle est oxydée avec l'augmentation du pH. A pH = 8, la superoxyde dismutase agit comme un inhibiteur puissant de l'oxydation spontanée de pyrogallol (Marklund et Marklund, 1974).

Le dosage de l'activité enzymatique de la SOD au niveau de l'homogénat a été effectué selon la méthode de Nandy et ses collaborateurs (2012). Brièvement, 1000 µL du tampon Tris-EDTA (pH 8.14) sont ajoutés à 36 µL du pyrogallol (100 mM dans 0.01N HCl). L'absorbance est mesurée pendant 60 s à 420 nm en présence ou en absence du 16 µL de l'homogénat. Une unité de la SOD est l'équivalent de la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber l'auto-oxydation du pyrogallol par 50 %. L'activité de la SOD exprimée en Unité/mg de protéine est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\textbf{Vitesse (V)} = (\textbf{Abs}_{\textbf{finale}} - \textbf{Abs}_{\textbf{initiale}}) / (\textbf{t}_{\textbf{final}} - \textbf{t}_{\textbf{initial}})$$

Le pourcentage d'inhibition (I%) est calculé selon la formule suivante :

$$\%\ \textbf{d'Inhibition} = [(V_P - V_E) / V_P] * 100$$

L'activité enzymatique de la SOD en unité internationale est calculée selon l'équation suivante :

$$\textbf{SOD (U)} = [(V_P - V_E) / (Vp * 0.5)]$$

**$V_P$** : Vitesse de l'auto-oxydation du pyrogallol en absence de l'enzyme.
**$V_E$** : Vitesse de l'auto-oxydation du pyrogallol en présence de l'enzyme (Homogénat).
**0.5** : exprime 50 % d'inhibition.

### II.4.9.5. Dosage des protéines totales

La méthode de Biuret en utilisant le Kit (Spinreact BSIS30-1) a été utilisé pour doser les protéines totales dans l'homogénat du foie et des reins. Ce test est basé sur la réaction entre les protéines et les sels de cuivre pour donner un complexe violet-bleu intense en milieu alcalin. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en protéines totales dans l'échantillon qui est déterminée en mesurant l'absorbance à 540 nm (Gornall *et*

*al*., 1949). Brièvement, 1 ml du réactif est ajouté à 25 µL d'homogénat. L'absorbance est mesurée à 540 nm, après 10 min d'incubation à température ambiante.

### II.4.10. Estimation de la xanthine oxydase

L'estimation de l'activité de la xanthine oxydase est effectuée selon le protocole de Bergmeyer et ses collaborateurs (1974) en suivant l'augmentation de la production de l'acide urique à 290 nm formé suite à l'oxydation de la xanthine en présence d'une source enzymatique (homogénat) par unité du temps. Brièvement, 333 µl de la xanthine (0.15 mM) sont ajoutés à 666 µl de tampon potassium phosphate (50 mM, pH 7.5) et 33 µl d'homogénat. La production de l'acide urique est suivie en mesurant la variation de l'absorbance pendant 1 min contre un blanc qui contient tous les réactifs à l'exception de l'homogénat qui est remplacé par l'eau distillée. L'activité enzymatique de la xanthine oxydase est calculée selon l'équation suivante :

**U/ml enzyme = ($\Delta A_{290\ nm/min}$ échantillon- $\Delta A_{290\ nm/min}$ Blanc) (1) / (12.2) (0.033)**

**1** = Volume Total.
**12.2** = Coefficient d'extinction milli-molaire de l'acide urique à 290 nm.
**0.033** = Volume de l'échantillon.

## II.5. Analyses statistiques

Les résultats des différents tests effectués *in vitro* et *in vivo* sont exprimés en moyenne ± SD et moyenne ± SEM, respectivement. Les valeurs d'$IC_{50}$ et d'$A_{0.5}$ sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. La comparaison des résultats obtenus est effectuée par ANOVA univariée, suivie du test de Dunnett pour les comparaisons avec les standards et test de Tukey's pour les comparaisons multiples en utilisant le logiciel « Graphpad Prism » version 5.0. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

# *Résultats et Discussion*

# I. Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro*

Un antioxydant peut être défini comme «toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations, par rapport à celles du substrat oxydable, retarde ou inhibe considérablement l'oxydation de ce substrat » (Gutteridge, 1994). Les effets antioxydants des produits naturels pourraient être considérés comme un premier aperçu pour détecter leur pertinence et leur potentiel pharmacologiques **(**Zengin *et al*., 2018). Plusieurs méthodes différentes sont nécessaires pour obtenir des valeurs fiables de capacité antioxydante (Bernaert *et al*., 2011). Pour plus de simplicité, les antioxydants ont été traditionnellement divisés en deux classes; antioxydants primaires ou antioxydant de type briseur de chaîne (de l'anglais «chain-breaking antioxidants») (agissant principalement par piégeage des ERO/ ERN), ainsi les étapes d'initiation ou de propagation radicalaires sont inhibées par l'antioxydant, et les antioxydants secondaires ou préventifs, agissant généralement par chélation des ions de métaux de transition, assurent ainsi l'inhibition de la production des radicaux libres et retardent le taux d'oxydation (Madhavi, 1996) . Dans cette étude, l'activité antioxydante de la curcumine a été évaluée sur la base de ces deux caractéristiques en utilisant: des tests qu'évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres (GOR, ABTS et OH), et la capacité réductrices (pouvoir réducteur, CUPRAC, et O-phénantroline), pour mesurer l'effet antioxydant primaire, tandis que l'effet antioxydant secondaire (préventif) a été déterminé par le test de chélation fer ferreux.

## I.1. Effet scavenger du radical Galvinoxyl

Le radical galvinoxyl (GOR) est un radical stable centré sur l'oxygène (O-centred galvinoxyl radical) il est similaire au radical DPPH, mais ce dernier est un radical centré sur l'azote (N-centred radical), il est utilisé pour estimer l'activité anti-radicalaire en mesurant la capacité des molécules à tester de réagir en tant que donneur d'électron ou d'atome d'hydrogène.

Selon Tirzitis et Bartosz (2010), le meilleur test pour évaluer le piégeage des radicaux libres (effet anti-radicalaire) consiste à utiliser le radical centré sur l'oxygène qui est étroitement liée aux radicaux dérivés de l'oxygène générés dans le système physiologique. De plus que le galvinoxyl est plus réactif avec les phénols que le DPPH.

Les résultats obtenus montrent que la curcumine possède la capacité à réduire le radical galvinoxyl d'une manière dose-dépendante (Figure 10) avec une $IC_{50}$ de l'ordre de 9.36 ± 0.09 µg/ml. Cet activité est significativement inferieure à celles des standards utilisés, BHT

et BHA, qui représentent des valeurs d'$IC_{50}$ égales à 4.99 ± 0.06 et 4.35 ± 0.13 µg /ml, respectivement (Figure 11).

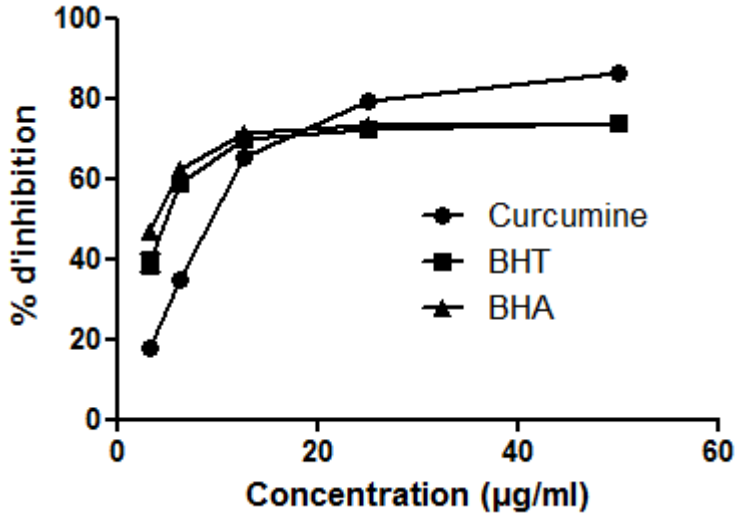



**Figure 10:** Activité anti-radicalaire de la curcumine, le BHT et le BHA vis-à-vis du radical galvinoxyl (GOR). Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD.

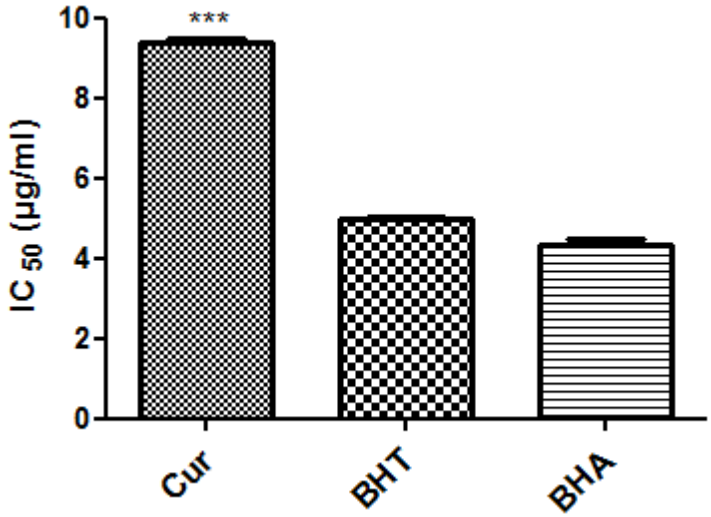



**Figure 11:** $IC_{50}$ de la curcumine, et des standards (BHT et BHT) vis-à-vis du radical galvinoxyl. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD. ***, $p \leq 0.001$.

### I.2. Réduction du radical-cation $ABTS^{+\bullet}$

En raison de sa simplicité, rapidité, sensiblité et reproductibilité, le test ABTS est la méthode colorimétrique la plus utilisée dans la littérature après le test du DPPH. Il est utilisé pour estimer l'effet antioxydant des différentes molécules. Son mécanisme dans la

réstion d'oxydation implique un processus de transfert d'atomes d'hydrogène et d'électrons (Re *et al*., 1999).

Les résultats de l'effet réducteur de la curcumine vis-à-vis du radical-cation $ABTS^{+\bullet}$, présentés dans la Figure 12, montrent que la curcumine exerce un effet antioxydant efficace et cet effet est dose-dépanadent avec une $IC_{50}$ égale à 1.43 ± 0.02 µg/ml, qui ne diffère pas significativement à celui des standards BHT, et BHA (1.29 ± 0.03, et 1.81 ± 0.10 µg/ml, respectivement) (Figure 13).

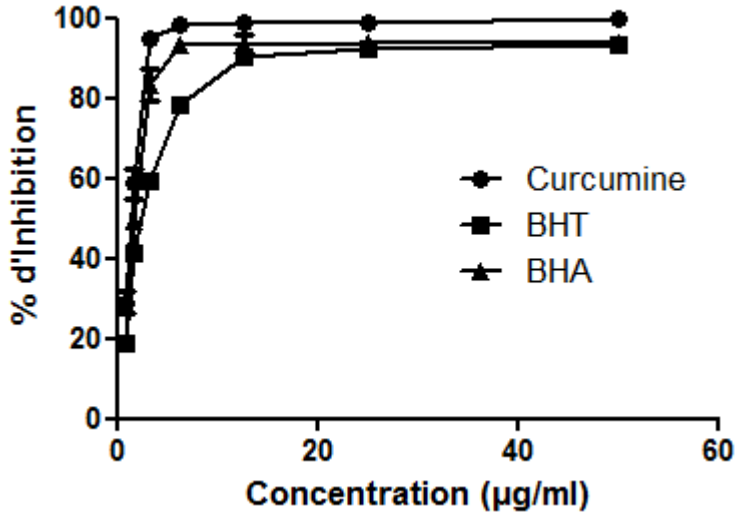



**Figure 12:** Effet piégeur du radical $ABTS^{+\bullet}$ par la curcumine, et les standards (BHT, et BHA).Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD.

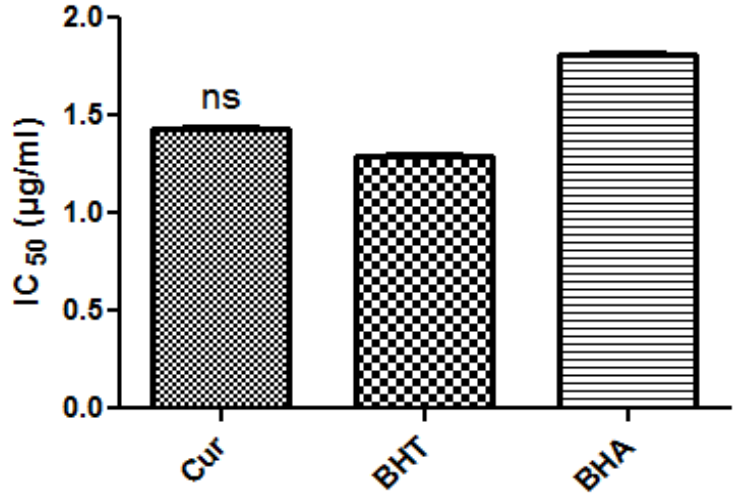



**Figure 13:** $IC_{50}$ d'effet piégeur du radical $ABTS^{+\bullet}$ par la curcumine, le BHT et le BHA. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD. ns : non significatif.

### I.3. Effet piégeur du radical Hydroxyle (OH•)

De plus, l'activité scavenger des radicaux libres de la curcumine est également évaluée vis-à-vis du radical hydroxyl, l'espèce réactive de l'oxygène la plus réactive. Cet essai indique que la curcumine est un scavenger efficace du radical OH• (Figure 14), avec une valeur d'$IC_{50}$ de 54.11 ± 3.32 µg/mL, cette valeur est 1.67 fois plus élevée que celle de l'acide ascorbique, utilisé comme standard, qui a montré une $IC_{50}$ de 32.33 ± 1.17 µg/mL (Figure 15).

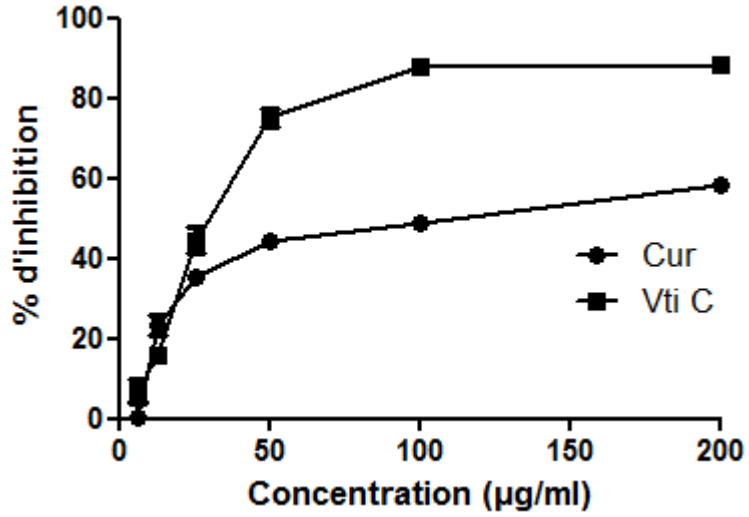



**Figure 14:** Effet piégeur du radical OH• par la curcumine et l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD.

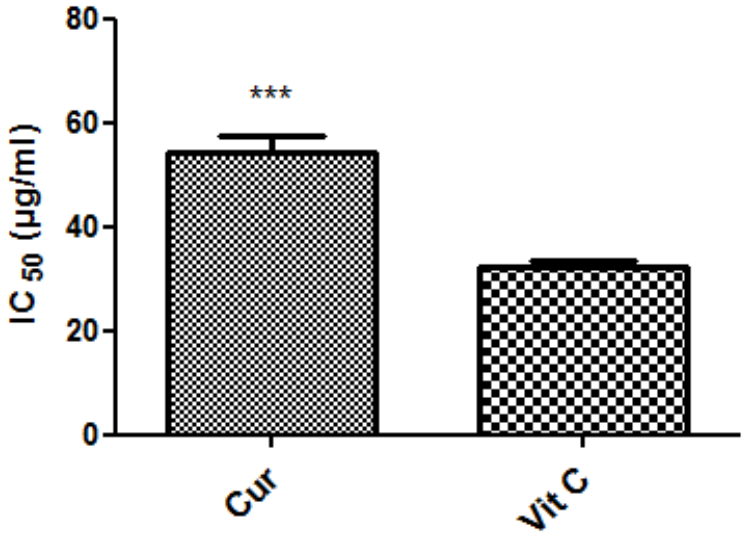



**Figure 15:** $IC_{50}$ d'effet piégeur du radical OH• par la curcumine et de l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD. *** : $p \leq 0.001$.

**I.4. Pouvoir réducteur**

Pour mesurer la capacité réductrice de la curcumine dans le test du pouvoir réducteur, la transformation des ions ferriques ($Fe^{3+}$) en ions ferreux ($Fe^{2+}$) est investiguée en suivant la méthode d'Oyaizu (1986). La propriété de réduction est généralement associée avec la présence des réductanes, qui possèdent la capacité à donner un électron aux radicaux libres et les convertir à une forme plus stable.

Les résultants présentés dans la Figure 16 montrent que la curcumine possède un effet réducteur efficace à différentes concentrations (0.1-50 µg/mL). Cet effet est dose dépendant (Figure 16).

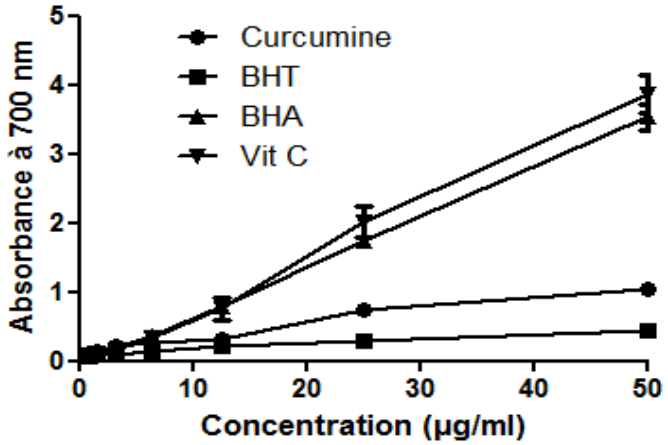



**Figure 16:** Pouvoir réducteur de la curcumine et des standards (Vit C, BHT et BHA). Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD.

Les résultats de la capacité réductrice sont exprimés en $A_{0.5}$ qui signifié la concentration qui donne une absorbance de 0.5 et présentés dans le Tableau 2. La curcumine a montré un excellent pouvoir réducteur via la capacité à donner des électrons avec une $A_{0.5}$ de l'ordre de 17.76 ± 0.07 µg/ml, qui est une capacité plus élevée par rapport à l'$A_{0.5}$ du BHT (> 50 µg/ml), mais inferieure à celui du BHA (8.41 ± 0.67 µg/ml) et de Vit C (9.01 ± 1.46) (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Le pouvoir réducteur représenté en $A_{0.5}$ de la curcumine et des standards

| **Echantillons** | **$A_{0.5}$ (µg/ml)** |
|---|---|
| **Curcumine** | 17.76 ± 0.06 *** |
| **BHT** | > 50 |
| **BHA** | 8.41 ± 0.67 |
| **Vit C** | 9.01 ± 1.46 |

Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD. *** : $p \leq 0.001$.

**I.5. Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)**

Le test CUPRAC est basé sur la mesure de l'absorbance d'un complexe stable formé par la néocuproine et les ions cuivreux à 450 nm, Les ions cuivreux sont produits par la réduction des ions cupriques par des antioxydants. Une absorbance plus élevée indique une capacité réductrice élevée. La valeur $A_{0.5,}$ correspondant à la concentration d'antioxydant nécessaire pour l'obtention d'une absorbance de 0.5, a été déterminée à partir du graphique d'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

Les résultats obtenus pour le test de CUPRAC indiquent une activité réductrice élevée de la curcumine. Cette actvité est dose-dépendante (Figure 17) et est considérée comme similaire à celle de l'antioxydant synthétique BHT (Figure 18), avec une $A_{0.5}$ de l'ordre de 10.57 ± 0.07 et 9.62 ± 0.87, respectivement. Par contre, elle est inférieure à celle de la BHA (3.64 ± 0.19 µg/mL).

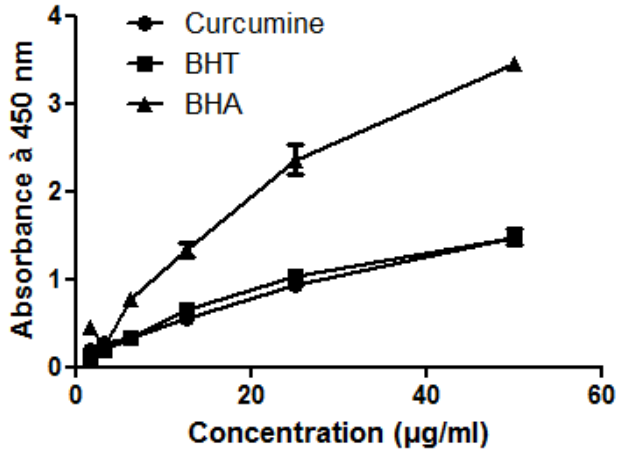



**Figure 17:** Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) de la curcumine, le BHT, et le BHA. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD.

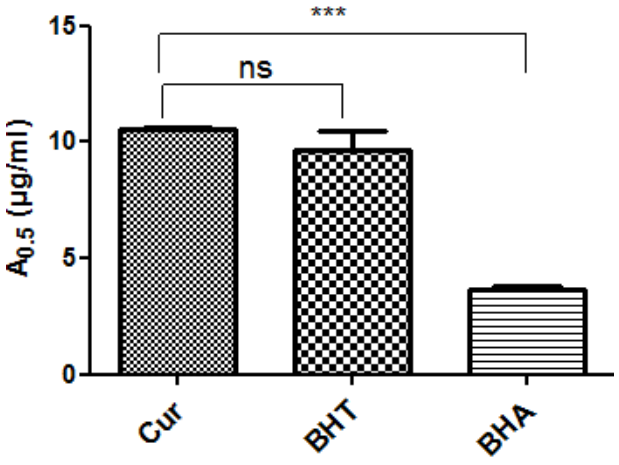


**Figure 18:** Capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC) représenté en $A_{0.5}$ par la curcumine, le BHT et le BHA. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD. ns : non significatif, *** : $p \leq 0.001$.

**I.6. Test de Phenanthroline**

Un autre test est utilisé pour évaluer la capacité réductrice de la curcumine, le test o-Phenanthroline, qui basé sur la transformation des ions ferriques ($Fe^{3+}$) en ions ferreux ($Fe^{2+}$), les résultats obtenus pour les différentes concentrations de la curcumine (0.1- 50 µg/mL) sont présenté dans la Figure 19.

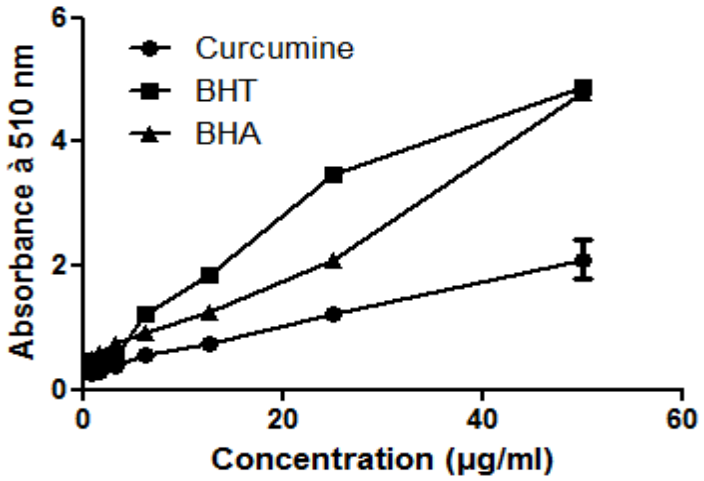



**Figure 19:** Activité sur la phenanthroline par la curcumine, le BHT et le BHA. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD.

Dans cette méthode, la curcumine a montré un faible effet par rapport aux standards, BHT et BHA, avec des valeurs de $A_{0.5}$ de l'ordre de 5.10 ± 0.17, 0.93 ± 0.07 et 2.24 ± 0.17 µg/mL, respectivement (Tableau 3).

**Tableau 3 :** $A_{0.5}$ de l'activité sur la O-phenanthroline de la curcumine et des standards (BHT et BHA)

| **Echantillons** | **$A_{0.5}$ (µg/ml)** |
|---|---|
| **Curcumine** | 5.1 ± 0.17*** |
| **BHT** | 0.93 ± 0.07 |
| **BHA** | 2.24 ± 0.17 |

Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD. *** : $p \leq 0.001$.

**I. 7. Chélation de fer ferreux**

L'activité chélatrice de fer ferreux est choisie pour mesurer l'effet antioxydant préventif via la capacité de la curcumine à chélater les ions ferreux. En effet, Ce composé a montré une capacité chélatrice (Figure 20), avec une valeur d'$IC_{50}$ d'environ de 100 µg/ml. Cette dernière est significativement superieure à celle du standard (EDTA) ($p \leq 0.001$) (Tableau 4), qui manifeste la meilleure capacité chélatrice, ($IC_{50} = 8.80 \pm 0.47$ µg/ml), Cette activité chélatrice est du au fait que l'EDTA possède une structure, caractérisée par la présence de deux atomes d'azote et quatre atomes d'oxygène portant au fragment carboxyle, ce qui lui confère une capacité de chélater les ions ferreux dans le centre et bloquer la formation d'un complexe $Fe^{2+}$-Ferrene, et reflète ainsi son excellant effet chélateur (Luo *et al*., 2011).

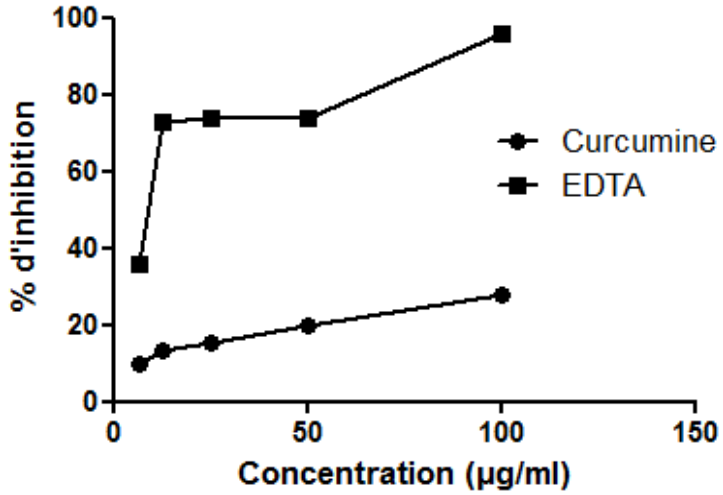



**Figure 20 :** Effet chélateur du fer ferreux de la Curcumine et du standard (EDTA). Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD.

**Tableau 4 :** $IC_{50}$ de la chélation de fer ferreux de la Curcumine et du standard (EDTA).

| **Echantillons** | **$IC_{50}$ (µg/ml)** |
|---|---|
| **Curcumine** | >100 *** |
| **EDTA** | 8.8 ± 0.47 |

Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD. *** : $p \leq 0.001$.

L'activité antioxydante de la curcumine a été estimée en se basant sur la division traditionnelle des antioxydants. Elle est évaluée en tant qu'un antioxydant primaire ou briseur de chaîne, via son effet directe à piéger des radicaux libres, et en tant d'un antioxydant secondaire ou préventif, agissant généralement par chélation des ions de métaux de transition, et diminuer la génération des radicaux.

les antioxydants primaires exercent leur action a travers la libération d'un atome d'hydrogène ($H^{\bullet}$), d'un électron ($e^-$) ou les deux, les méthodes utilisées pour mesurer l'activité antioxydante sont généralement classés à des tests basés sur le transfer d'atome d'hydrogène (HAT, hydrogen atom transfer) et sur le transfer d'électron (ET, électrons transfer) selon le mécanisme antioxydant de la molécule (Apak *et al*., 2016). Pour évaluer ces deux propriétés de la curcumine on a estimé l'activité scavenger des radicaux libres, en utilisant le test GOR, ABTS, et $OH^{\cdot}$, qui reflètent la capacité à donner des électrons et un proton (HAT), et d'autre par on a estimé la capacité réductrice, en utilisant la méthode du pouvoir réducteur, du CUPRC, et de O-phenanthroline, qui reflètent la capacité à donner des électrons (ET).

Les résultants obtenus par ces essais montrent que la curcumine possède une bonne activité scavenger des radicaux libres, soit vis-à-vis le radical galvinoxyl, ABTS, ou même le radical hydroxyl, qui est une espèce réactive d'oxygène extrêmement réactive formée dans le système biologique. L'$OH^{\cdot}$ est considéré comme une espèce très néfaste impliquée dans les pathologies liées aux radicaux libres. Il est capable d'endommager toutes molécules trouvées dans les cellules vivantes (Hochestein et Atallah., 1988). Cet effet scavenger reflète le pouvoir de la curcumine à donner des électrons et des protons. Ces résultats supportent et confirment ceux obtenus par plusieurs études antérieures (Ak et Gülçin., 2008 ; Asouri *et al*., 2013). Ces travaux ont montré que la curcumine possède une activité antioxydante et antiradicalaire importante par rapport aux standards et molécules de synthèse.

Un puissant antioxydant scavenger des radicaux, agit souvent comme un puissant réducteur. La méthode du pouvoir réducteur et d'O-phenanthroline mesurent la capacité de l'antioxydant à réduire l'ion ferrique Fe (III), alors que la méthode de CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Power), mesure la capacité à réduire l'ion cuprique Cu (II) à leur état de valence inférieur respectif. Les résultats de la capacité réductrice de la curcumine, évaluer dans la présente étude démontrent et confirment que la curcumine est un puissant

réducteur, non seulement en réduisant les ions ferriques montré dans ce travail, et avec des études antérieures (Ak et Gülçin., 2008 ; Asouri *et al*., 2013) mais aussi elle agit comme un réducteur puissant de cuivre. Il est important de noter qu'il n'y a aucune étude dans la littérature sur le pouvoir antioxydant réducteur de cuivre de la curcumine. Ce test est plus avantageux que les autres tests basés sur le transfert d'électrons du fait de la valeur du pH appliquée et qui est égale au pH physiologique. De plus, cette méthode permet de tester à la fois les antioxydants hydrophiles et lipophiles (Apak *et al*., 2016). La méthode de CUPRAC utilisée seule est suffisante pour mesurer à la fois l'activité antioxydante et antiradicalaie (Özyürek *et al*., 2011). Ainsi, l'évaluation de la capacité antioxydante de la curcumine par cette méthode est plus complète et permet de démontrer que cette molécule est un puissant antioxydant.

D'un autre côté, la curcumine présente une activité chélatrice des métaux de transition efficace. Cet effet antioxydant de la curcumine chélatant l'ion de métal de transition (Fe (II)) peut inhiber les réactions de type Fenton qui produisent le radical hydroxyle.

La capacité antioxydante importante de la curcumine évaluée par le test ABTS, OH, pouvoir réducteur, et par le test de chélation de fer ferreux, est accordé et supporté par des études antérieurs (Ak et Gülçin., 2008 ; Asouri *et al*., 2013). Dans notre étude, nous avons confirmé cette excellente activité antioxydante de la curcumine pour la première fois par les méthodes. (GOR, CUPRAC et O-phénantroline). Selon Priyadarsini et ses collaborateurs. (2003), l'origine de l'activité antioxydante de la curcumine provient principalement du groupe -OH phénolique, bien qu'une petite fraction puisse être due au site > CH2.

Les résultants de la présente étude, classent la curcumine comme un excellent antioxydant primaire, grâce à sa capacité de donner des atomes d'hydrogène (HAT) et des électrons (ET), et comme un puissant antioxydant préventive.

**II. Activité anti-inflammatoire *in vitro***

La dénaturation des protéines est bien documentée parmi les causes de l'inflammation. Pour investiguer en partie l'activité anti-inflammatoire de la curcumine, on a étudié la capacité de cette dernière à inhiber la dénaturation des protéines. Les résultats obtenus montrent l'efficacité de cette substance à inhiber la dénaturation de l'albumine induite par la chaleur, et cette inhibition est dose-dépendante (Figure 21).

Les résultats présentés dans la Figure 21, révèlent que la curcumine à des concentrations faibles égales à 125, 250, et 500 µg/ml présentent une faible protection vis-à-vis de la dénaturation de l'albumine induite par la chaleur, avec des pourcentages d'inhibition de 0.57 ± 1.67, 1.36 ± 1.45 et 2.39 ± 1.90, respectivement. Ces valeurs sont très inferieures à celle du voltarène ($p \leq 0.001$), l'anti-inflammatoire standard, qui a donné des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 49.69 ± 0.33 et 77.99 ± 0.99 et une inhibition maximale 98.61± 0.62, aux mêmes concentrations que la curcumine. A une concentration égale à 1000 et 2000 µg/ml, la curcumine a montré un pourcentage de protection important avec des valeurs de 47.58 ± 0.89 et 91.98 ± 0.80, respectivement. L'$IC_{50}$ de la curcumine est de l'ordre de 1181.69 ± 1.117 µg/ml, alors qu'elle est 127.57 ± 1.45 µg/ml pour le voltarène (Figure 22).

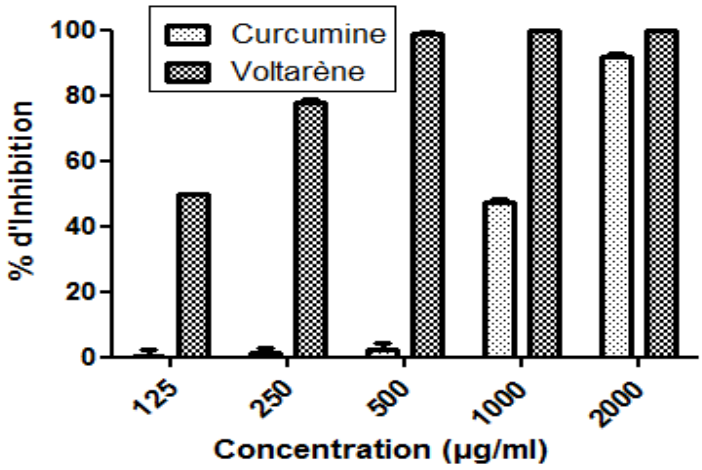



**Figure 21:** Pourcentage d'inhibition de la dénaturation de l'albumine induite par la chaleur par la curcumine et le voltarène. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD.

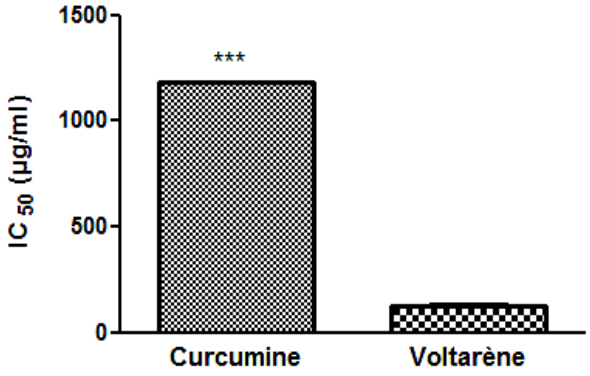



**Figure 22:** Inhibition de la dénaturation thermique de l'albumine par la curcumine et le voltarène. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD. *** : $p \leq 0.001$.

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire à cause d'un stress externe ou d'un composé dénaturant tel que les ROS. La plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées. La dénaturation des protéines est une cause bien documentée d'inflammation (Leelaprakash et Mohan, 2011), et conduit à plusieurs maladies inflammatoires, telle que la PR (Vane et Botting, 1995). La production d'auto-antigènes dans certaines maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines.

Dans le cadre d'investiguer l'un des mécanismes de l'activité anti-inflammatoire, la capacité de la curcumine atténuer la dénaturation des protéines a été étudiée en mesurant la turbidité du milieu réactionnel, qui est due à la formation de grands coagulums de BSA dénaturées par la chaleur. La turbidité est un bon indicateur de la dénaturation des protéines (Kitabatake *et al*., 1989). Les résultats obtenus ont montré que la curcumine est efficace pour bloquer la dénaturation de l'albumine induite par la chaleur d'une manière dose-dépendante (Figure 21). À partir de la valeur d'$IC_{50}$, il est évident que la curcumine est moins active que le voltarène, son activité protective vis-à-vis de la dénaturation est efficace à des concentrations élevées (Figure 21). D'après Mizushima et Kobayashi (1998) le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatique, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines. Il a été rapporté que quand les protéines perdent leurs interactions nette des forces intermoléculaires dicte le comportement de viscosité, où dans l'attraction intermoléculaire conduit à une viscosité de solution plus élevée (Yadav *et al*., 2011), Ainsi, l'effet anti-dénaturation de la curcumine serait, peut être, dû au maintien / ou à l'etablissement des interactions avec les différents groupements pour lesquels les liaisons originales altérées, en cas échéant, au cours du chauffage, portégeant ainsi les protéines de la dénaturation et ce qui permet par conséquence de diminuer la viscosité du milieu.

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

### III. Inhibition de la xanthine oxydase (XO) *in vitro*

La xanthine oxydase (XO) catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine, puis la xanthine en acide urique, ce dernier forme habituellement des ions et des sels appelés urates et acides d'urates dans le sérum. L'étude de l'effet inhibiteur de l'enzyme XO par la curcumine a été faite en suivant la diminution de la production de l'acide urique dans le milieu réactionnel. Les résultants obtenus montrent que la curcumine possède une bonne activité inhibitrice vis-à-vis de la XO, de manière dose dépendante (Figure 23). A 1mg/ mL, le pourcentage d'inhibition est > 60% et l'$IC_{50}$ de la curcumine est significativement ($P \leq 0.001$) superieure à celle de l'allopurinol (standard), avec une valeur de 0.71 ± 0.06 mg/ml et 0.44 ± 0.02 mg/ml, respectivement (Figure 24).

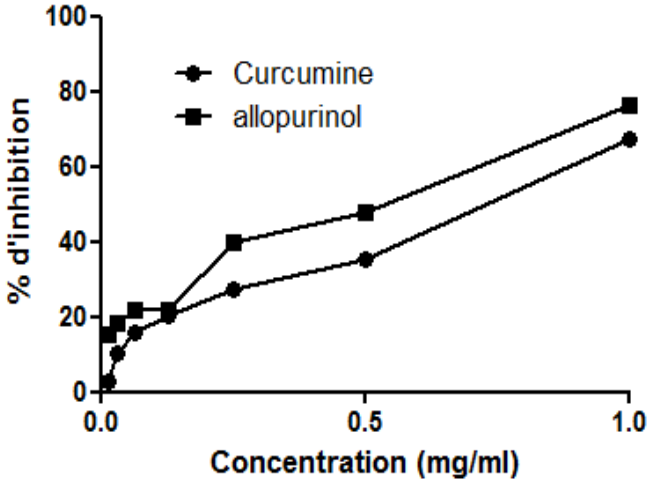



**Figure 23:** Pourcentage d'inhibition de la XO par la curcumine et l'allopurinol. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD.

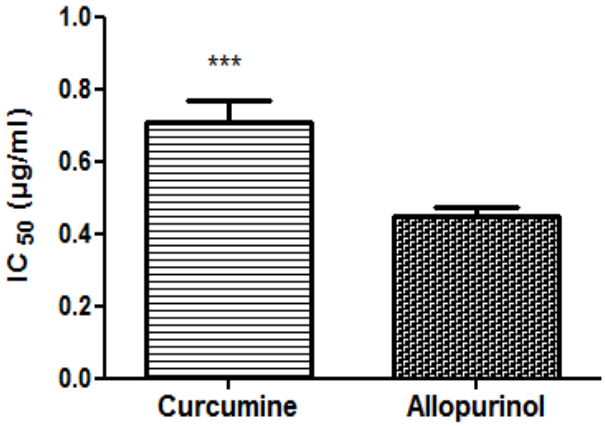



**Figure 24:** $IC_{50}$ de la Curcumine et de l'allopurinol vis-à-vis la XO. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± SD. *** : $p \leq 0.001$.

La xanthine oxydase (XO) catalyse la transformation de l'hypoxanthine en xanthine, puis en acide urique comme produit final d'oxydation (O'Mahony *et al*., 2013), accompagnant la production d'espèces réactifs d'oxygène (ROS) qui entrainent différents dommages tissulaires (Battelli *et al*., 2014). L'acide urique forme généralement des ions et des sels appelés urates et acides urates dans le sérum. L'hyperuricémie est le principal facteur étiologique de la goutte (Changyi *et al*., 2016). De récentes études ont montré que l'incidence de la goutte et de l'hyperuricémie dans le monde a augmenté de façon spectaculaire (Nile *et al*., 2014). Plusieurs enquêtes cliniques ont confirmé que l'hyperuricémie est également un facteur de risque indépendant des pathologies cardiovasculaires, d'hypertension, de diabète et de nombreuses autres maladies (Battelli *et al*., 2018).

L'inhibition de la XO n'est pas indiquée uniquement pour réduire l'effet de l'urate, mais se traduit également par un effet antioxydant indirect par l'inhibition des ERO produites au cours de la réaction catalysé par cette enzyme.

En général, les inhibiteurs de la XO ne sont pas nombreux. L'allopurinol, est le médicament de choix pour l'inhibition de la XO et permet la diminution de l'urate dans le sang. Cepedant, il provoque de graves effets secondaires (Nile *et al*., 2013), notamment des irritation gastro-intestinale, syndromes d'hypersensibilité, fièvre, hépatite, éosinophilie et toxicité rénale (Lin *et al*., 2014). Par conséquent, de nouvelles molécules alternatives douées d'une activité thérapeutique avérée et des effets secondaires plus faibles sont souhaitées.

La XO contient un domaine molybdoptérine (Mo) qui est le site actif de l'enzyme (Enroth *et al*., 2000 ; Metz et Thiel, 2009) ; Les inhibiteurs standards de l'enzyme; l'allopurinol et le 3,4-dihydroxy-5-nitrobenzaldéhyde (DHNB) inhibent l'activité de la XO via l'interaction avec son centre Mo (Lu *et al*., 2013 ; Pauff *et al*., 2009). Umamaheswari et ses collaborateurs (2009) ont rapporté que l'inhibition de l'activité de la XO par les polyphénols et les flavonoïdes est due à leurs interactions avec le site actif de cette enzyme. Par conséquent, il est possible que l'activité inhibitrice de la XO de la curcumine suit le même mécanisme. Finalement, la puissante inhibition de la XO par la curcumine peut rendre cette molécule un candidat potentiel pour prévenir ou ralentir la progression de la goutte et de toutes maladies liées à l'hyperuricémie et au stress oxydatif.

**IV. Effet de la curcumine sur l'arthrite rhumatoïde induite par le CII chez les rats**

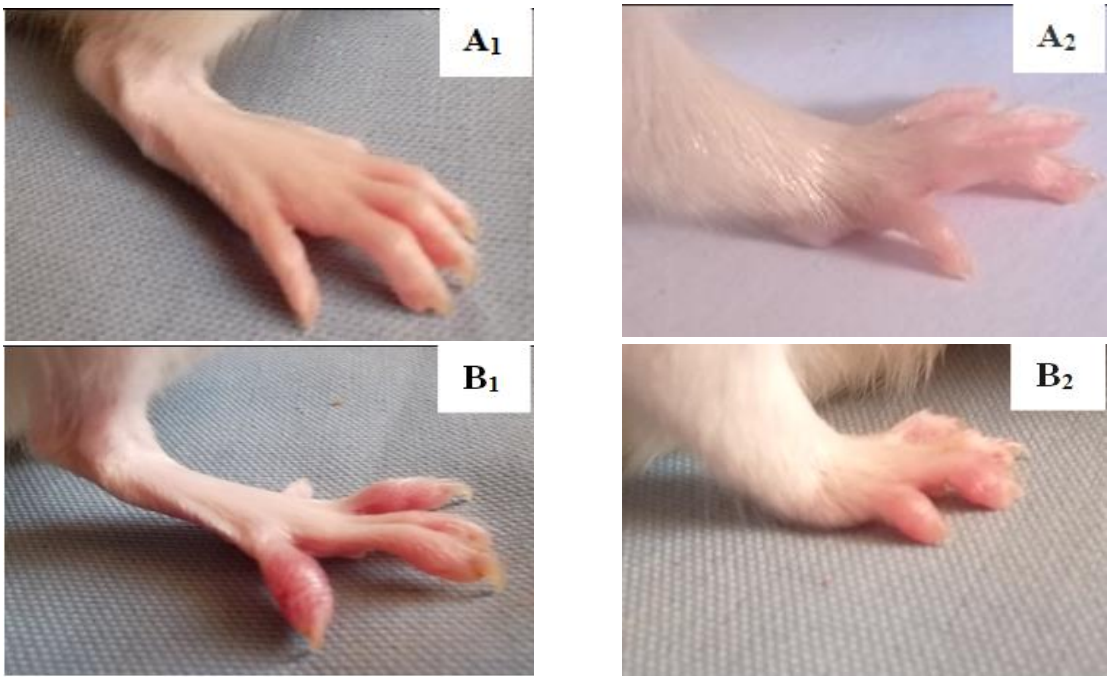
**IV.1. Evolution de l'arthrite rhumatoïde chez les rats induits au CII**

L'arthrite rhumatoïde (PR) provoquée dans cette étude est celle induite par le collagène type II (CII) chez des rats *Albino wistar*. Il s'agit d'un modèle couramment utilisé pour étudier la PR humaine du fait qu'il partage, avec celle–ci, les mêmes caractèristiques immunologiques et pathologiques.

L'arthrite auto-immune est induite, en premier temps, par immunisation intradermique en utilisant une émulsion d'adjuvant complet de Freund et de collagène type II (CII), suivi par un rappel après sept jours, par du CII émulsifié avec d'adjuvant incomplet de Freund, pour assurer une incidence et une sévérité élevées de l'arthrite.

Après trois à cinq jours de leur première immunisation, les rats deviennent peu réactifs et perdent de l'appétit. Ils présentent des ulcèrations au niveau des points des injections intradermiques, avec guérison entre sept à dix jours.

Les signes cliniques de la PR sont le gonflement et la rougeur des pattes. Ils sont apparus dans tous les groupes à partir le 14 $^{ème}$ jour de la première immunisation, et ont atteint le maximum le 27$^{ème}$ jour avec des scores différents entre les groupes (Figure 25).



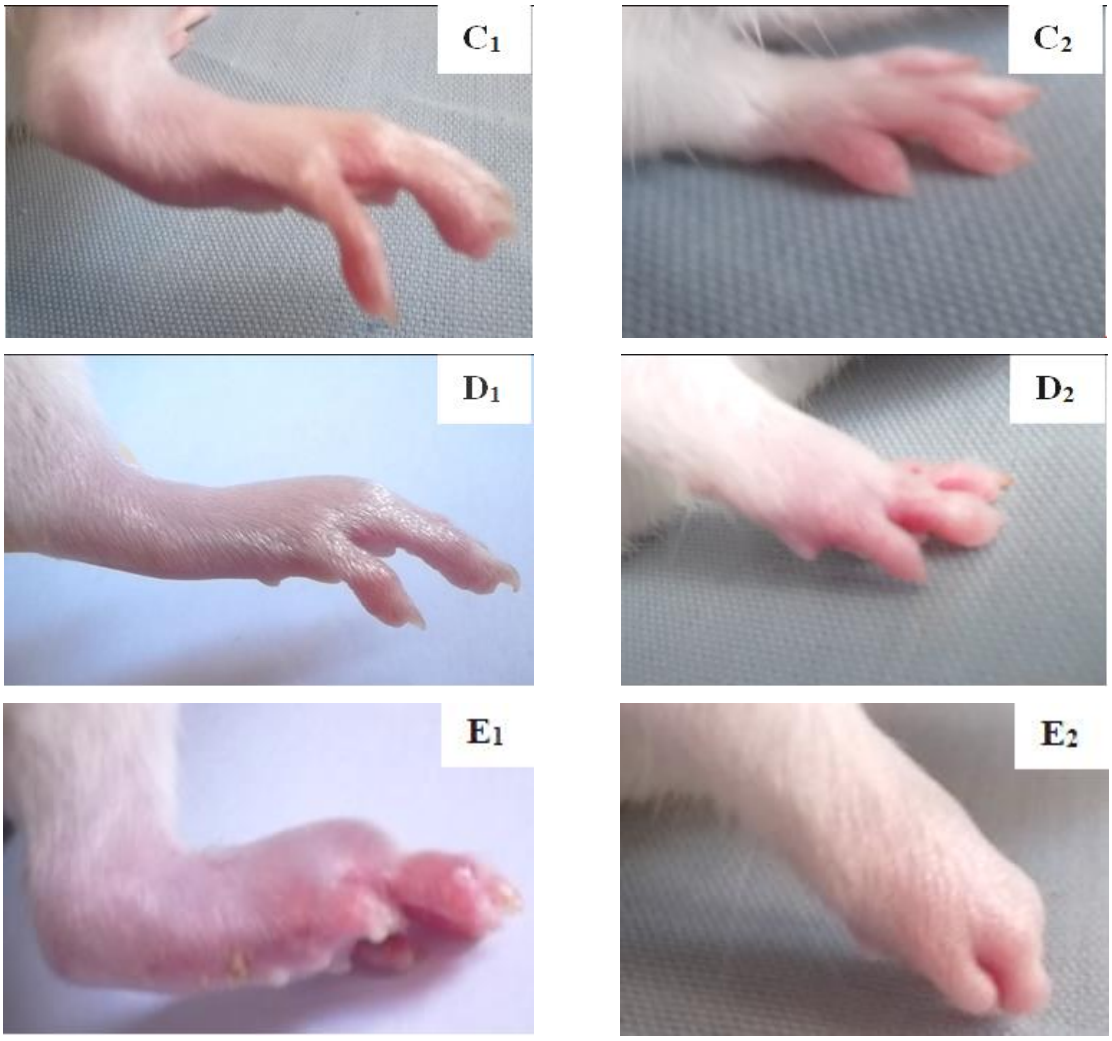



**Figure 25:** Différentes évolutions et scores cliniques de l'arthrite observés après 21 jours de l'induction de l'arthrite par le collagène type II pour les pattes antérieures **(1)** et les pattes postérieures **(2)**. **A :** Score 0, **B:** Score 1, **C :** Score 2, **D :** Score 3, **E :** Score 4.

Le pourcentage de l'apparition de la maladie a été important chez les différents groupes, allant jusqu'à 90 % dans le groupe CIA. Le gonflemment des articultions a été observé premièrement dans les pattes inférieures et chez tous les rats malades, de façon bilatérale, puis dans les pattes supérieures, chez la plupart des rats malades.

### IV.2. Effet préventif et curatif de la curcumine

L'évaluation des effets préventif et curatif de la curcumine (110 mg/kg) a été réalisée en suivant le poids corporel, l'épaisseur des paumes et des plantes des pattes, et l'indice de sévérité arthritique (score arthritique), les paramètres hématologiques, les atteintes radiologiques et histopathologiques et finalement sur le stress oxydatif.

### IV.2.1. Score arthritique

Le score arthritique est un critère utilisé pour décrire et manifester les signes cliniques de l'inflammation (rougeur er gonflement) de différentes articulations. Le score utilisé dans cette étude est le suivant : Score 0, pas de gonflement ni rougeur des pattes; Score 1, rougeur et/ou gonflement dans un seul type d'articulation, Score 2, rougeur et/ou gonflement dans 2 types d'articulation, Score 3, rougeur et/ou gonflement dans 3 types d'articulation; Score 4, rougeur et/ou gonflement dans 4 types d'articulation, y compris la patte entière, entraînant une ankylose et une perte de mobilité articulaire.

Dans cette étude, le jour de l'apparition des signes cliniques varie d'un groupe à un autre. Ainsi, chez les rats du groupe négatif (CIA) et le groupe destiné pour un traitement curatif par la curcumine (CIA+Cur$^{C}$) les signes cliniques de la PR ont commencé à apparaitre à partir le 11$^{ème}$ jour. Le score arthritique chez les rats du groupe CIA était de 7.9 ± 3.99 au 17$^{ème}$ jour ce dernier correspond à l'apparition de la maladie chez tous les rats affectés pour tous les groupes, où l'incidence de l'arthrite chez ce groupe est égale à 90%, ce score atteint son maximum au 27$^{ème}$ jour (10.4 ± 3.31), suivi par une chute légère avec une valeur de 9.1 ± 3.31 au 40$^{ème}$ jour de l'étude (Figure 26), accompagnée d'une ankylose et une perte de mobilité articulaire chez la plupart des rats malades, notamment chez ceux qui ont manifesté des sévérités élevées (signes cliniques sévères).

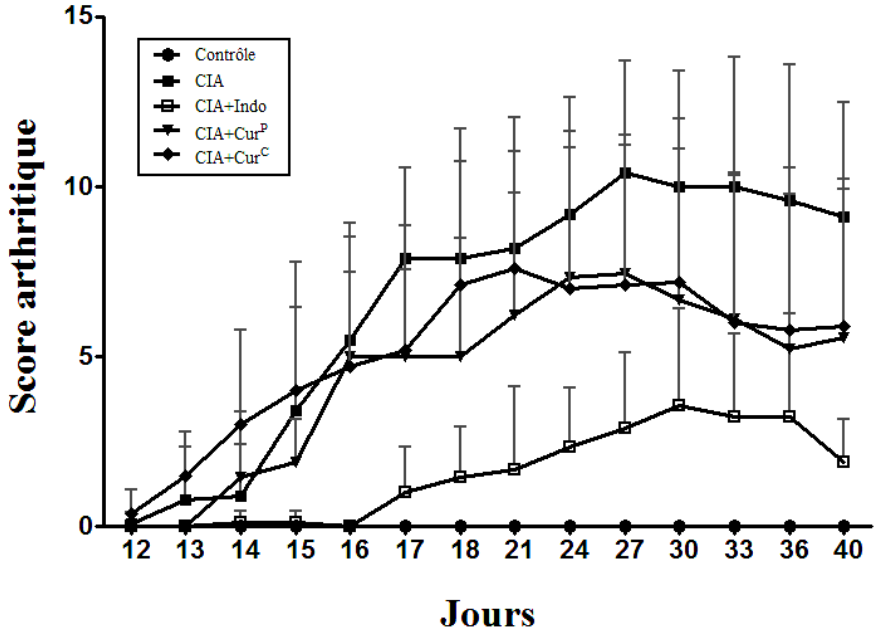



**Figure 26 :** Effet préventif et curatif de la curcumine, et de l'indométacine sur les scores arthritiques chez des rats CIA. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n = 10).

Le traitement préventif par la curcumine à 110 mg/kg/jour a retardé l'apparition des signes cliniques de la PR d'une part. D'autre part, elle a diminué la sévérité de ces signes. Le score arthritique au 17$^{ème}$ jour était de 5 ± 3.57, l'incidence de l'arthrite chez ce groupe est égale à 80 %, ces valeurs sont inferieures par rapport au groupe CIA, qui présente une valeur de 7.9 ± 3.99 pour le score au 17$^{ème}$ jour soit une incidence de 90% de PR. Le score arthritique atteint son maximum au 27$^{ème}$ jour (7.44 ± 5.79), puis il a diminué au cours des derniers jours d'étude jusqu'à atteindre une valeur égale à 5.55 ± 5,38 au 40$^{ème}$ jour mais restant significativement inférieure ($p \leq 0.05$) à celui du groupe CIA.

Par ailleurs, le traitement curatif par la curcumine (110 mg/kg/jour) dés le 14 $^{ème}$ jour de l'immunisation, a montré un effet curatif important vis-à-vis la diminution de la sévérité des signes cliniques de la PR induit par le CII, en comparaison avec le groupe CIA, sachant que le jour d'apparition de maladie et l'incidence de l'arthrite dans ce groupe est identique avec celui du groupe CIA. Le score arthritique atteint sa valeur maximale le 21$^{ème}$ jour (7.6 ± 4.44), puis diminue jusqu'à 5.9 ± 4.32, le dernier jour de l'étude.

De sa part, l'indométacine a montré une très bonne activité préventive et thérapeutique, avec une incidence de 55.55 % et un score arthritique maximal de 3.55 ± 2.84, il a diminué de façon significative ($p \leq 0.05$) la sévérité de la maladie par rapport au groupe CIA.

D'autre part, on peut prendre en considération le nombre moyen des pattes touchées par ces signes dans chaque groupe comme indicateur de l'effet préventif et curatif de la curcumine et de l'indométacine. Ce nombre est de l'ordre de 2.44 ± 1.42, 2.55 ± 1.33, et 0.88 ± 0.92 pour les trois groupes respectivement soit un nombre assez inferieur à celui de groupe CIA (3.11 ± 1.16).

### IV.2.2. Evolution du gonflement des pattes

Les tissus autour des articulations de certains rats ont gonflé modérément et la peau a commencé à rougir après 17 à 19 jours après la première immunisation. Le gonflement et la rougeur de la peau sont devenus de plus en plus sévères, notamment au niveau des articulations des chevilles. Les coussinets des pattes des rats ont épaissi et une rougeur diffuse est apparue au niveau des griffes antérieures, chez les rats ayant atteint le score 4.

Les manifestations d'arthrite les plus sévères ont été observées après 27 jours de la première injection. La sévérité du gonflement chez les rats malades a été suivie et évaluée chaque 3 jours dés le 1$^{er}$ jour de l'induction de l'arthrite jusqu'au 40$^{ème}$ jour de l'étude

(Figure 27) en mesurant l'épaisseur des plantes pour les pattes inferieures, et l'épaisseur des paumes pour les pattes supérieures à l'aide d'un pied à coulisse digital.

Les rats arthritiques (CIA) ont développé un œdème important très significative ($p \leq 0.01$) en comparaison avec les pattes des rats du groupe contrôle. Le gonflement des pattes chez les rats arthritiques était significatif a partir le 17$^{ème}$ jour (5.45 ± 0.62 mm), le gonflement atteint son maximum au 27$^{ème}$ jour est devenu hautement significatif ($p \leq 0.001$) avec une valeur de 7.91 ± 0.48 mm. Au dernier jour, l'œdème a diminué jusqu'à 5.96 ± 0.53 mm ($p \leq 0{,}01$) (Figure 26).

Après 27 jours du traitement préventif et 14 jours du traitement curatif à la curcumine, une diminution significative ($p \leq 0.01$, $p \leq 0.05$, respectivement) du volume de l'œdème des pattes a été remarquéé en comparaison avec le groupe CIA et l'éppaisseur était devenue de 5.93 ± 1.06 mm, et 6.34 ± 1.23 mm au 27$^{ème}$ jour respectivement. Il s'agit d'une diminution remarquable mais reste non significative ($p > 0.05$) du gonflement des pattes des rats pour les deux traitements en comparaison avec le groupe CIA au cours des derniers jours du traitement (Figure 27).

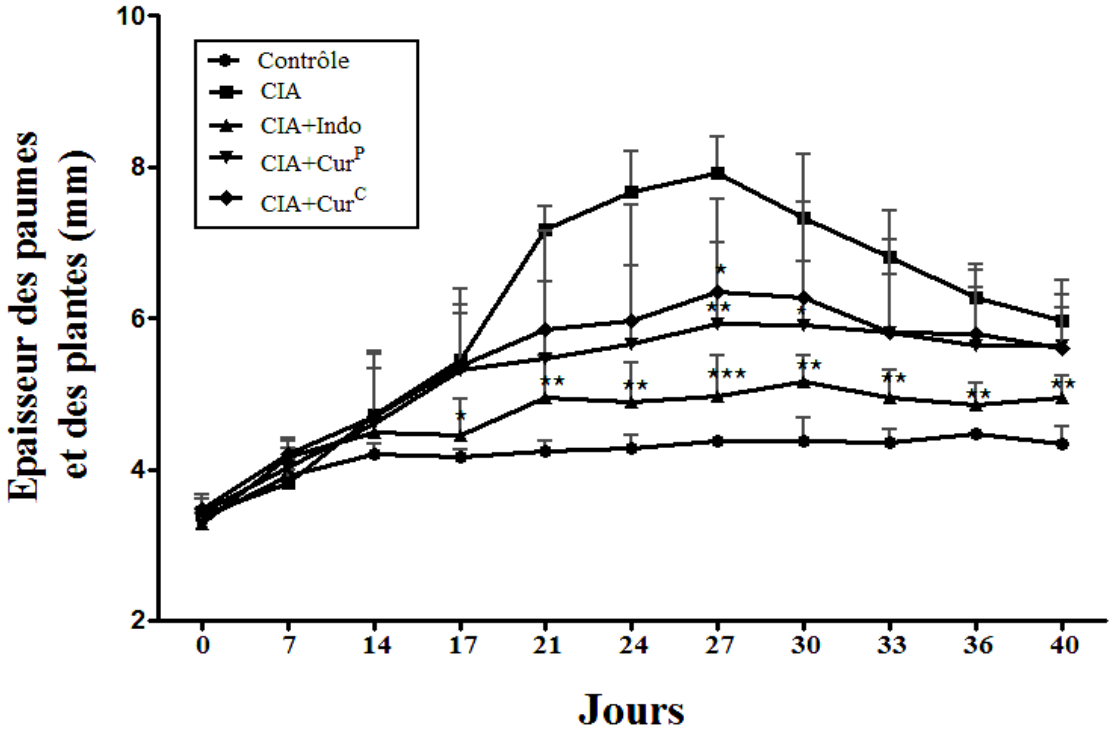



**Figure 27 :** Effet préventif et curatif de la curcumine sur l'épaisseur des paumes et des plantes des pattes des rats CIA. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n = 10). *: $p \leq 0.05$ ; ** : $p \leq 0.01$; *** : $p \leq 0.001$.

Le traitement par le standard l'indométacine, a montré un effet très significatif ($p \leq 0.01$) par rapport au groupe CIA, où tous les rats malades dans ce groupe manifestent un gonflement qui ne diffère pas significativement ($p > 0.05$) par rapport au groupe contrôle normale au cours de tous les jours de l'étude.

A la fin de cette étude le gonflement articulaire a régressé et une ankylose avec une difficulté à marcher significative a pu être observée chez certains rats, surtout les rats qui ont présenté un gonflement très sévère.

### IV.2.3. Evolution du poids corporel

Au cours de l'évolution des signes cliniques de la PR, le gonflement accompagné de douleur empêche ou rend difficile le déplacement des rats vers la nourriture. Le poids des rats arthritique du groupe CIA et les rats du groupe CIA+$Cur^C$ a diminué par rapport au groupe contrôle, cette diminution devient significative ($p \leq 0.05$) à partir du 21$^{ème}$ jour alors que les groupes traités avec de l'indométacine (CIA+Indo) et la curcumine (CIA+$Cur^P$) est resté plus ou stable au cours de l'étude (Figure 28).

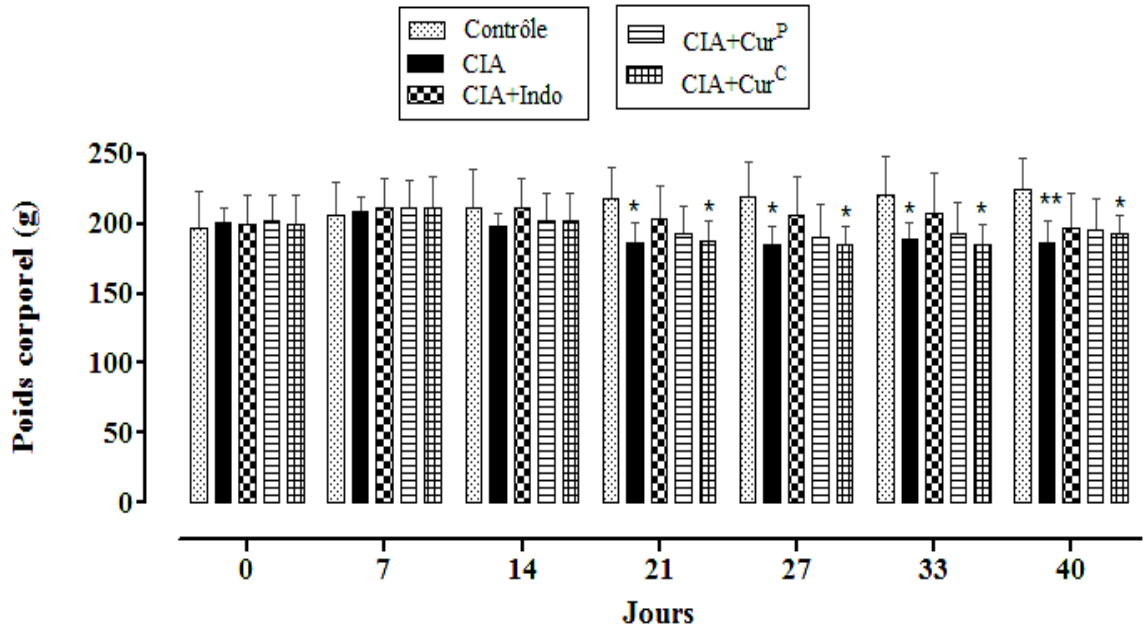



**Figure 28 :** Effet préventif et curatif de la curcumine sur le poids corporel chez des rats CIA. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n = 10) ; *: $p \leq 0.05$ ; ** : $p \leq 0.01$.

### IV.2.4. Paramètres hématologiques

Les paramètres hématologiques étudiés sont l'hémoglobine (HB), le nombre des globules rouges (GR), et des globules blancs (GB). Les résultats présentés dans le Tableau 5, montrent qu'il n y a pas de différences significatives ($p > 0.05$) entre le taux

d'hémoglobine et de nombre des globules rouges des rats des différents groupes en comparaison au groupe contrôle.

Par contre, le nombre des leucocytes du groupe CIA est significativement élevé ($p \leq 0.05$) par rapport à celui des rats normaux, avec des valeurs égales à 10.74 ± 0.96 et 6.13 ± 0.68 ($^{x}10^{3}$/cmm) dans les deux groupes respectivement. Néanmoins, les groupes traités par la curcumine et l'indométacine ne présentent pas une différence significative ($p > 0.05$) avec le groupe contrôle, avec des valeurs très proches aux valeurs de ce dernier.

**Tableau 5 :** Effet de la curcumine sur les paramètres hématologiques.

| Groupe | Paramètres Hématologiques | | |
|---|---|---|---|
| | **GR** ($^{x}10^{6}$/cmm) | **HB** (g/dl) | **GB Total** ($^{x}10^{3}$/cmm) |
| **Contrôle** | 7.84 ± 0.54 | 13.83 ± 0.55 | 6.13 ± 0.68 |
| **CIA** | 6.86 ± 0.21 $^{ns}$ | 12.3 ± 0.2 $^{ns}$ | 10.74 ± 0.96 * |
| **CIA+Indo** | 7.6 ± 0.69 $^{ns}$ | 12.83 ± 0.70 $^{ns}$ | 4.58 ± 1.63 $^{\#}$ |
| **CIA+Cur$^{P}$** | 7.23 ± 0.40 $^{ns}$ | 13.8 ± 0.54 $^{ns}$ | 7.55 ± 1.07 $^{ns}$ |
| **CIA+Cur$^{C}$** | 7.63 ± 0.36 $^{ns}$ | 12.82 ± 0.62 $^{ns}$ | 8.38 ± 2.45 $^{ns}$ |

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n=10) ; * : $p \leq 0.05$, une différence significative par rapport au groupe Contrôle normale. $^{\#}$ $p \leq 0.05$, une différence significative par rapport au groupe CIA. ns : non significative.

### IV.2.5. Examen radiologique

Après le sacrifice, les pattes des rats prélevées ont subi à un examen radiologique (Figure 29, A, B, C, D, E). Dans le groupe CIA l'imagerie radiographique montre un gonflement de tissu qui entoure les articulations, avec une érosion sévère du cartilage et de l'os, une structure articulaire fracturée, une ostéoporose autour de l'articulation ont également été observés. Tous ces changements sont observés beaucoup plus dans les pattes postérieures (Figure 29 B).

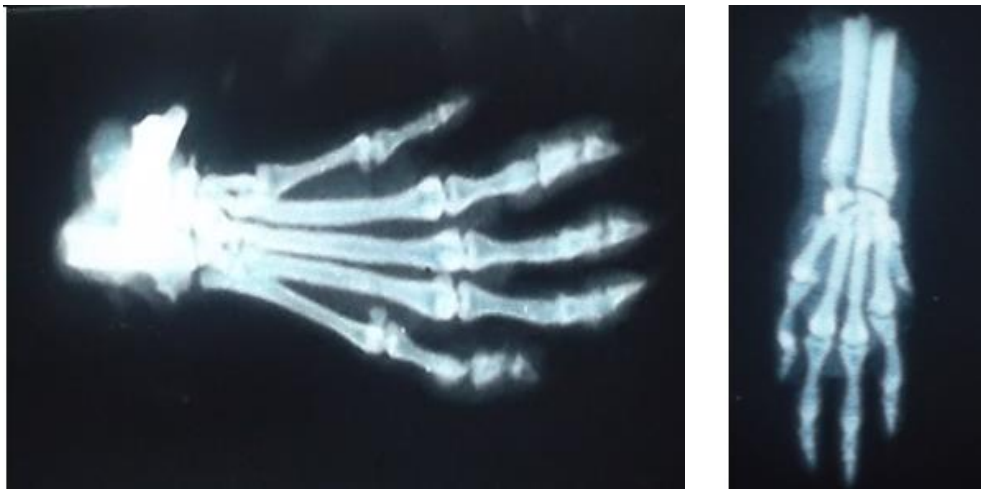
Dans le groupe CIA+Cur$^{C}$, une érosion du cartilage modérée accompagnée d'un interligne articulaire pincé, le niveau de destruction d'os est plus léger en comparaison au groupe CIA, avec une diminution remarquable de l'ostéoporose (Figure 29 E).

Par contre, l'imagerie radiographique des articulations du groupe CIA+Cur$^{P}$, est caractérisé par une absence d'ostéoporose, et d'érosion d'os, avec érosion modéré du cartilage traduit par un interligne articulaire pincé (Figure 29 D).

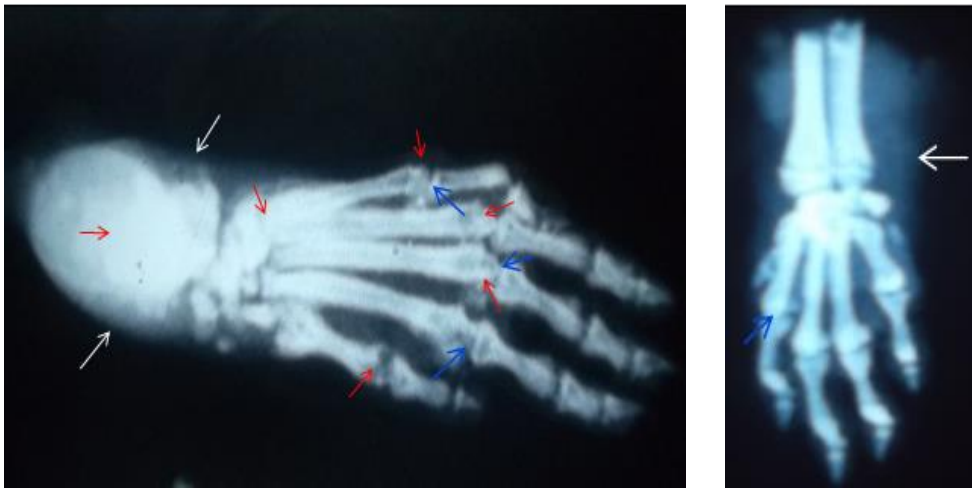
Le traitement avec l'indométacine montre une disparition totale d'érosion d'os et d'ostéoporose, et une érosion légère du cartilage (Figure 28 E).

**Pattes postérieurs** **Pattes antérieurs**

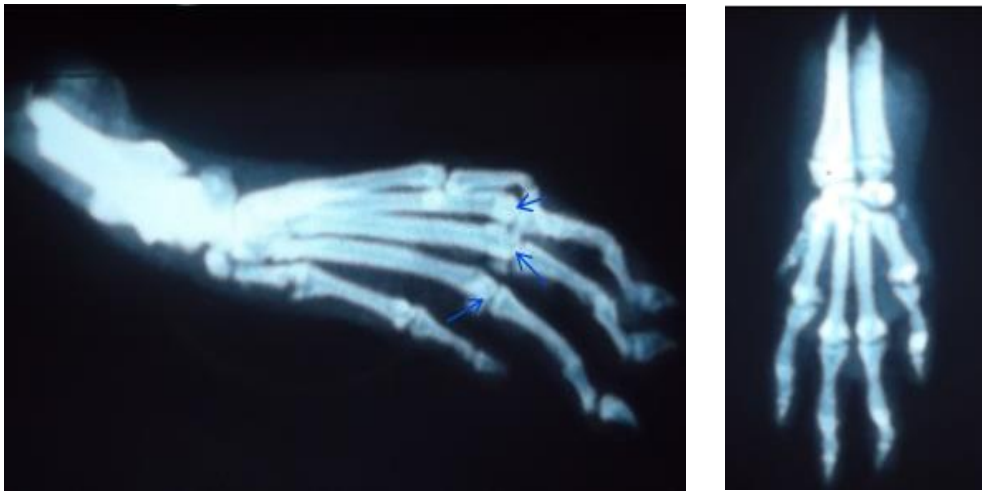
**A**



**B**



**C**



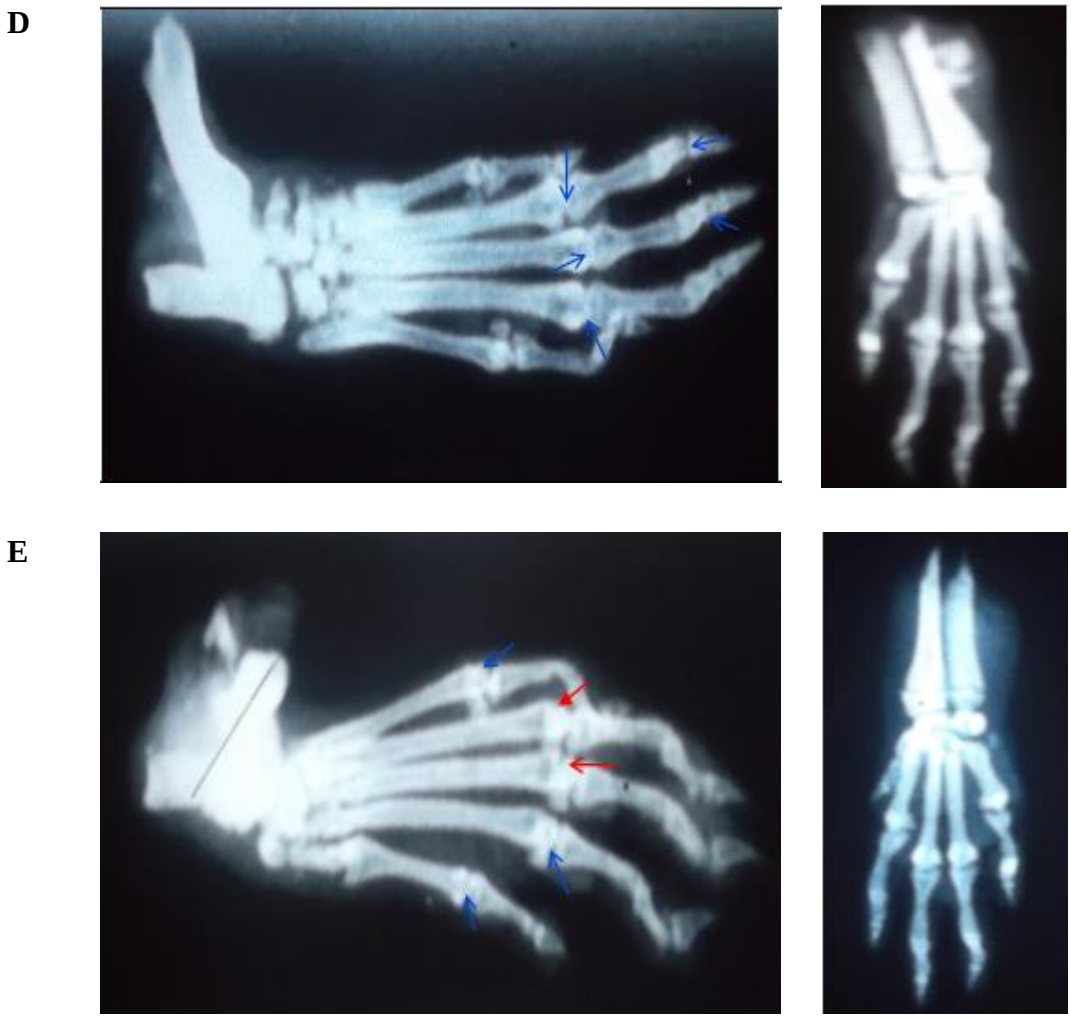



**Figure 29 :** Radiographies des articulations des pattes antérieures et postérieures montrent un gonflement de tissu (flèche blanche), érosion d'articulation (flèche bleu) et érosion d'os (flèche rouge). **(A)** correspond au groupe contrôle normal, **(B)** au groupe CIA, **(C)** au groupe CIA+Indo, **(D)** au groupe CIA+$Cur^{P}$ et **(E)** au groupe CIA+$Cur^{C}$.

Les scores radiographiques des articulations des pattes postérieures ont été évalués comme suivant: score 0, normal, pas de gonflement de tissu ou des dommages osseux; score 1, gonflement de tissu et œdème; score 2, érosion d'articulation (du cartilage); score 3, érosion d'os et formation d'ostéophyte (Cuzzocrea *et al*., 2001). Les résultats obtenus sont montrés dans la Figure 30, le score du groupe contrôle égal à 0 ; le score du groupe CIA est de 5.33 ± 0.57, un score hautement significative ($p \leq 0{,}001$) par rapport au contrôle; le score du groupe CIA+$Cur^{C}$ est de 2.83 ± 1.47, il est significativement diminué ($p \leq 0.05$) par rapport au score du groupe CIA; le score du groupe CIA+$Cur^{P}$ est de 2.4 ± 1.14, celui du CIA+Indo de 1.6 ± 0.89, qui sont des scores significativement inferieurs ($p \leq 0.001$) par rapport au groupe CIA. Le score du groupe CIA+$Cur^{P}$ et CIA+Indo est diminué de 54.97% et 69.98 % par rapport à celui du groupe CIA, respectivement.

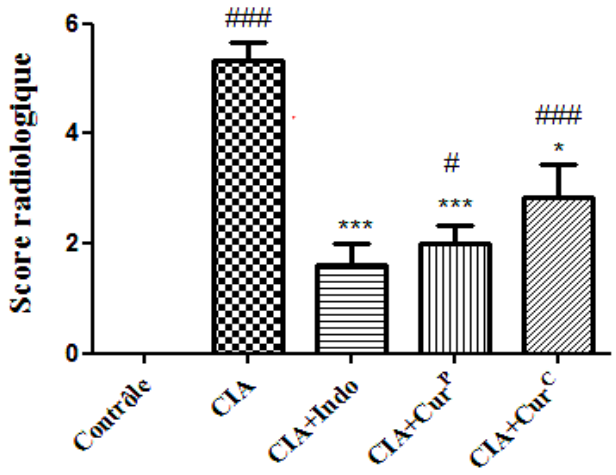



**Figure 30 :** Score radiologique évalué pour les articulations bilatérales des pattes postérieures. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n=10) ; * : $p \leq 0.05$, *** $\leq$ 0.001 une différence significative par rapport au groupe CIA. $^{###} \leq 0.001$ une différence significative par rapport au groupe contrôle normal.

### IV.2.6. Examen histopathologique

Les changements histologiques se sontt produits et sont dus aux réactions inflammatoires au niveau des articulations, ces effets ont été évalués à la fin de l'expérience. Les caractères histopathologiques observés sont: 1) l'infiltration des cellules inflammatoires; 2) l'hyperplasie synoviale; 3) formation de pannus ; 4) l'érosion de l'os et de cartilage.

La coloration H&E des articulations des pattes supérieures et inferieures chez les rats CIA (Figure 31 et 32) a révélé une synovite sévère. Un grand nombre de cellules inflammatoires infiltrées et agrégées dans les tissus et une structure semblable à un nodule lymphatique s'est formée. Les cellules synoviales ont proliféré sur une dizaine de couches, accompagné avec une formation de pannus et diminution ou suppression de l'espace articulaire, les tissus osseux et cartilagineux des articulations sont extrêmement erronés (endommagés) (Figure 31 et 32). Le traitement préventif avec la curcumine (110 mg/ kg/ jour) a diminué la sévérité, voir empêcher l'apparition de certains caractères histopathologiques. En comparaison avec le groupe CIA, les articulations des animaux du groupe CIA+Cur$^{P}$ présentent une diminution ou même disparition significative de l'infiltration cellulaire, la formation de pannus et l'érosion du cartilage et de l'os avec une hyperplasie synoviale légère. Ces résultats ne diffèrent pas significativement de ceux du groupe CIA+Indo. Le traitement curatif avec la curcumine a montré également une diminution importante de la sévérité des dommages histopathologiques par rapport au groupe CIA (Figure 31 et 32).

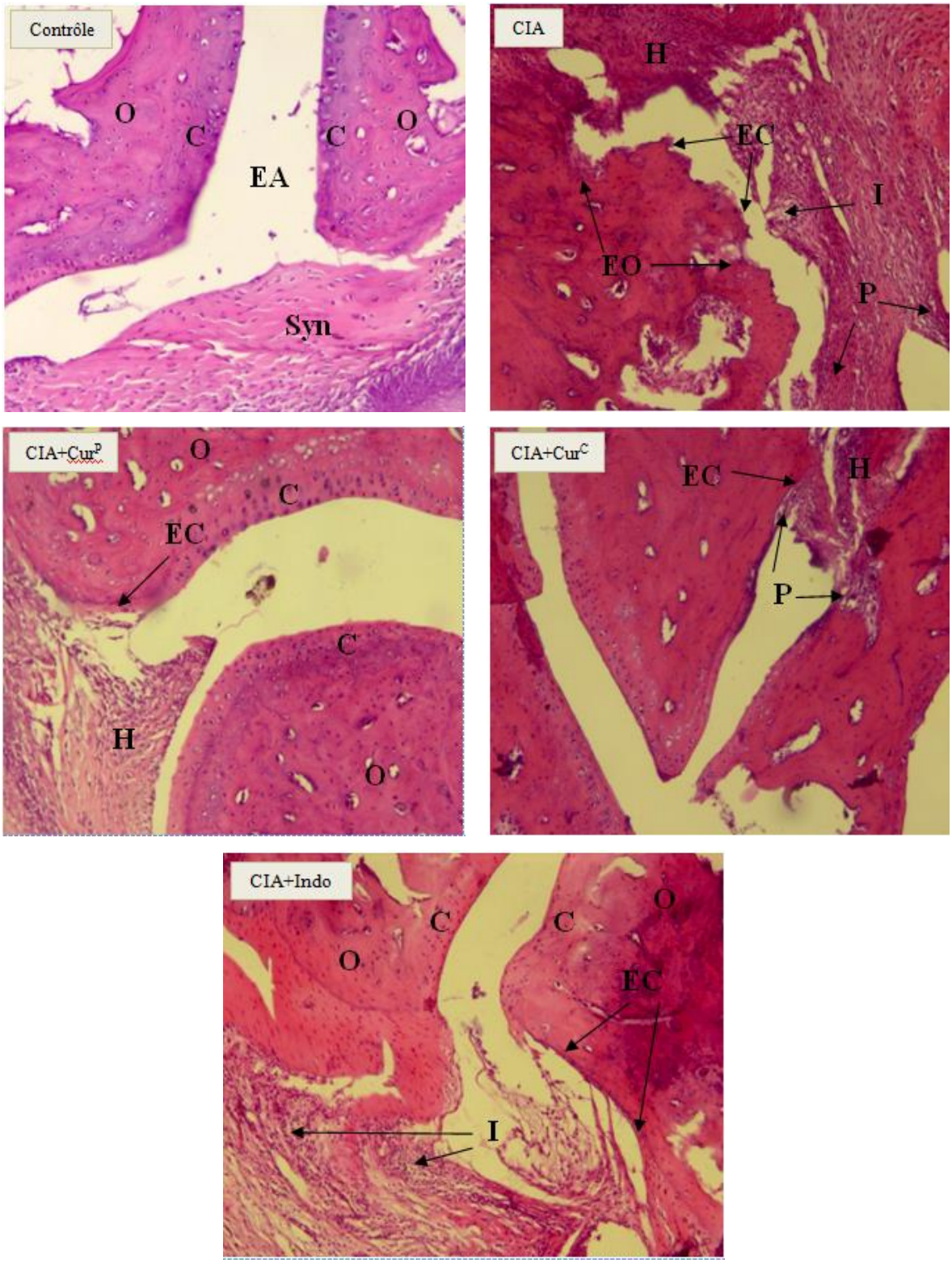



**Figure 31:** Effet de la curcumine aux changements histopathologiques au niveau de l'articulation de la cheville des rats arthritiques colorés au H&E (x 40). Chaque image est l'une des 10 phtographies réalisées de chaque groupe. Contrôle: Contrôle normale; CIA: Contrôle négatif; CIA+ Indo: indomethacine (3 mg/kg), CIA+ $Cur^P$: Traitement préventif de la curcumine (110 mg/kg); CIA+ $Cur^C$: Traitement curatif de la Curcumine (110 mg/kg). **C:** cartilage; **O:** os; **EA:** espace articulaire; **Syn:** synovium; **P:** Pannus; **I:** infiltration cellulaire; **EC:** Erosion du cartilage; **EO:** Erosion de l'os; **H:** hyperplasie.

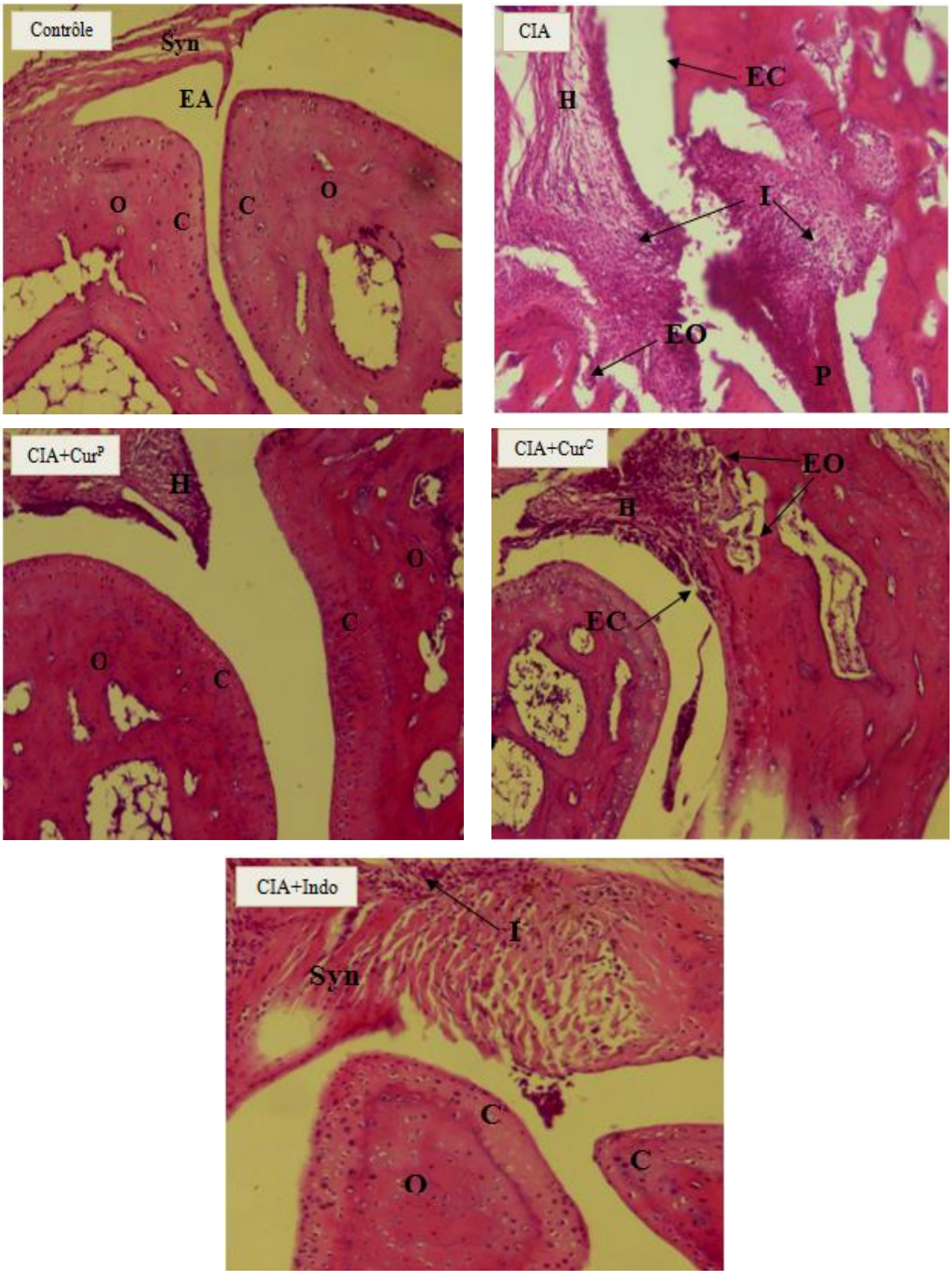



**Figure 32:** Effet de la curcumine sur les changements histopathologiques au niveau de l'articulation du poignet des rats arthritiques colorés au H&E (x40). Chaque image est l'une des 10 phtographies réalisées de chaque groupe. Contrôle: Contrôle normale; CIA: Contrôle négatif; CIA+ Indo: indométacine (3 mg/kg), CIA+ $Cur^P$: Traitement préventif de la Curcumine (110 mg/kg); CIA+ $Cur^C$ : Traitement curatif de la curcumine (110 mg/kg). **C:** cartilage; **O:** os; **EA:** espace articulaire; **Syn:** synovium; **P:** Pannus; **I:** infiltration cellulaire; **EC:** Erosion du cartilage; **EO:** Erosion de l'os; **H:** hyperplasie.

Le score des dommages articulaires des différents groupes est présenté sur la figure 33. Le score du groupe CIA+Cur$^{p}$, montre que ce traitement diminue la sévérité des dommages histopathologiques avec un taux de 60.46 % par rapport au groupe témoin CIA ($p \leq 0.01$). Le traitement curatif dans le groupe CIA+Cur$^{c}$ réduit la sévirité avec un taux de 44.18 % ($p \leq 0.05$) (Figure 33). Tandis que l'indométacine a maintenu les articulations des différents dommages de façon hautement significative en comparaison avec le groupe CIA ($p \leq 0.01$). Cette protection est de l'ordre de 70 %, ce qui donne un aspect histologique très proche des articulations du groupe sain (Figure 33).

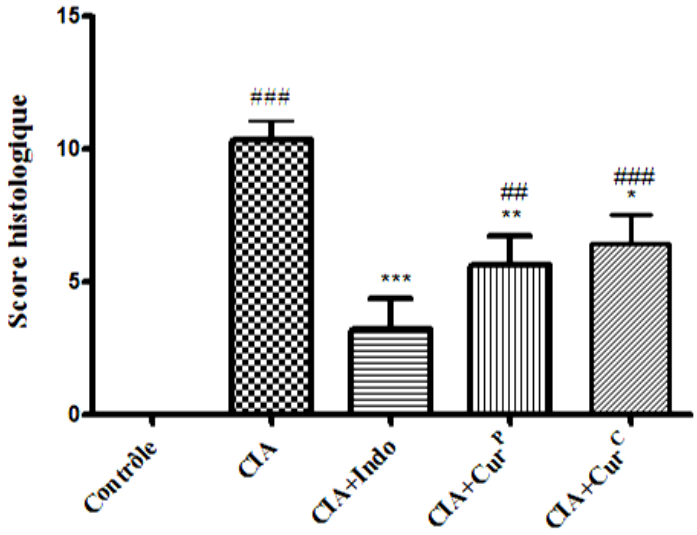



**Figure 33 :** Score histathologique évalué pour les articulations bilatérales de la cheville des pattes postérieures. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n=10) ; * : $p \leq 0.05$, ** $\leq 0.01$, *** $\leq$ 0.001 une différence significative par rapport au groupe CIA. $^{\#\#} \leq 0.01$ $^{\#\#\#} \leq 0.001$ une différence significative par rapport au groupe contrôle normal.

### IV.2.7. Potentiel antioxydant *in vivo* dans le cas de l'arthrite

L'évaluation du l'effet de la curcumine sur le stress oxydant dans le cas de l'arthrite a été réalisé en mesurant l'antioxydant endogène (GSH), par la détection des dégâts que les radicaux libres causent sur les lipides (MDA), et par l'évaluation de l'activité des enzymes antioxydants la CAT et la SOD, ainsi la XO au niveau de l'homogénat du foie et des reins.

#### IV.2.7.1. Au niveau de l'homogénat du foie

Les résultats obtenus par notre étude (Tableau 6) au niveau de l'homogénat du foie révèlent une augmentation très significative ($p \leq 0.01$) du taux du MDA au niveau de l'homogénat du foie des rats du groupe CIA, avec une valeur de 142.37 ± 19.31 nmol/g de tissu par rapport à celui du groupe sain (95.83 ± 7.55 nmol/g de tissu), ce qui reflète qu'il y'a une forte peroxydation lipidique. Les traitements préventif et curatif des rats

arthritiques avec la curcumine (110 mg/kg/jour) a maintenu un taux normal du MDA qui ne diffère pas significativement de celui des rats du groupe contrôle, avec des valeurs de 87.90 ± 13.94 et 90.22 ± 16.21 nmol/g de tissu, pour les groupes CIA+$Cur^P$ et CIA+$Cur^c$, respectivement. Ce taux est très significativement faible que celui du groupe CIA. De même, le traitement avec l'indométacine, a montré presque le même effet, avec un taux égal à 74.55 ±15.20 nmol/g de tissu (Tableau 6).

Par contre, Le taux hépatique de l'antioxydant GSH est significativement ($p \leq 0.01$) diminué (3.06 ± 0.80 µmol/ mg de prot) chez les rats CIA, par rapport aux rats sains du groupe contrôle (5.38 ± 0.47µmol/ mg de prot). Néanmoins, le traitement prophylactique des rats par la curcumine a augmenté de façon importante ($p \leq 0.001$) le taux du GSH (7.96 ± 1.29 µmol/ mg de prot) en comparaison avec le groupe CIA, et le groupe contrôle, et il est, même, significativement ($p \leq 0.001$) élevé par rapport à celui du groupe traité avec l'indométacine (5.21 ± 0.95 µmol/ mg de prot), cette augmentation en GSH peut expliquer en partie la diminution du taux de MDA dans ce groupe. D'autre part, le traitement curatif n'a pas manifesté une amélioration significative ($p > 0.05$) du taux du GSH, mais il l'a maintenu à l'état normale avec une valeur égale à 6.5 ± 0.56 µmol/ mg de prot.

A propos de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) au cours de la PR induite chez le rat, l'évaluation de l'activité du SOD n'a montré aucune différence significative ($p > 0.05$) entre les différents groupes, bien qu'on observe une diminution remarquable de l'activité de cette enzyme dans le groupe arthritique (51.05 ± 5.60 U/mg) contre une valeur égale à 84.96 ± 13.44 U/mg, pour le groupe contrôle normal (Tableau 6).

De même, le groupe arthritique CIA et le groupe traité avec l'indométacine n'ont montré aucun effet significatif ($p > 0.05$) vis-à-vis de l'activité de la CAT. Par ailleurs, l'administration de la curcumine, que ce soit pour un traitement prophylactique ou curatif, a augmenté l'activité de CAT, avec une activité égale à 89.81 ± 8.19 U/mg et 58.76 ± 4.80 U/mg, respectivement. Ces valeurs représentent une activité hautement significativement ($p \leq 0.001$, et $p \leq 0.01$) pour les deux types de traitements, respectivement, en comparaison avec le groupe contrôle normal (32.03 ± 2.36 U/mg), le groupe arthritique (22.70 ± 3.97 U/mg) et avec le groupe traité par l'indométacine (40.73 ± 14.58 U/mg) (Tableau 6).

**Tableau 6 :** Effet de la Curcumine sur les marqueurs du stress oxydant au niveau de l'homogénat du foie.

| | Homogénat du foie | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **SOD (**U/mg**)** | **CAT (**µmole/min/mg pro**)** | **GSH (**µmol/ mg de prot**)** | **MDA (**nmol/ g de tissu**)** |
| **Contrôle** | 84.96 ± 13.44 | 32.03 ± 2.36 | 5.38 ± 0.47 | 95.83 ± 7.55 |
| **CIA** | 51.05 ± 5.60$^{ns}$ | 22.70 ± 3.97 $^{ns}$ | 3.06 ± 0.80 ** | 142.37 ± 19.31** |
| **CIA+Indo** | 91.74 ± 7.15 $^{ns}$ | 40.73 ± 14.58$^{ns}$ | 5.21 ± 0.95$^{\#\#}$ | 74.55 ± 15.20$^{\#\#\#}$ |
| **CIA+Cur$^{P}$** | 81.59 ± 28.43 $^{ns}$ | 89.81 ± 8.19**$^{, \#\#\#}$ | 7.96 ± 1.29***$^{, \#\#\#}$ | 87.90 ± 13.94$^{\#\#\#}$ |
| **CIA+Cur$^{C}$** | 65.16 ± 14.28 $^{ns}$ | 58.76 ± 4.80$^{\#\#}$ | 6.5 ± 0.56 $^{\#\#\#}$ | 90.22 ± 16.21$^{\#\#\#}$ |

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n=10) ; ** : $p \leq 0.01$, *** $\leq$ 0.001 une différence significative par rapport au groupe Contrôle normal. $^{\#\#} \leq 0.01$, $^{\#\#\#} \leq 0.001$ une différence significative par rapport au groupe CIA. ns : non significative.

### IV.2.7.2. Au niveau de l'homogénat des reins

Les résultats obtenus au niveau de l'homogénat du rein (Tableau 7) sont un peu différents de ceux obtenus dans l'homogénat du foie. En ce qui concerne le taux du MDA, on note une augmentation hautement significative ($p \leq 0.001$) chez les rats du groupe CIA avec une valeur de 141.98 ± 11.91 nmol/g de tissu par rapport à celui du groupe sain (85.19 ± 6.15 nmol/g de tissu). Une diminution hautement significative ($p \leq 0.001$) du taux du MDA est observée avec le traitement préventif de la curcumine (70.37 ± 18.01 nmol/g de tissu). Par contre, le traitement curatif n'a aucun effet sur le taux du MDA (106.44 ± 10.21 nmol/g de tissu) par rapport au groupe CIA. De même, le traitement par l'indométacine, a diminué significativement ($p \leq 0.001$) le taux du MDA, par rapport au groupe arthritique, avec un taux égal à 74.55 ± 15.20 nmol/g de tissu.

Pour le taux rénale en GSH, une diminution hautement significative ($p \leq 0.001$) est notée chez le groupe CIA (5.96 ± 0.15 µmol/ mg de prot). Les traitements prophylactiques et curatif des rats à la curcumine, et le traitement par l'indométacine ont maintenu un taux normal du GSH par rapport à son taux chez les rats sains du groupe contrôle (Tableau 7).

Concernant l'activité des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) au niveau de l'homogénat du rein, l'évaluation de l'activité du SOD n'a montré aucune différence significative entre les différents groupes, sauf le groupe CIA+Indo qui a montré une augmentation significative de l'activité de cette enzyme (133.86 ± 25.6 U/mg de prot), par rapport au

groupe négatif 96.25 ± 22.47 U/mg de prot. De même, le groupe CIA et le groupe CIA+Cur$^{C}$ n'ont montré aucun effet significatif ($p > 0.05$) vis-à-vis l'activité de l'enzyme CAT. Par ailleurs, l'administration préventive de la curcumine et de l'indométacine a augmenté significativement ($p \leq 0.05$) l'activité de CAT avec des valeures de 72.671 ± 3.05 U/mg de prot et 72.76 ± 7.02 U/mg de prot respectivement, en comparaison avec le groupe négatif (46.41 ± 1.88 U/mg) (Tableau 7).

**Tableau 7 :** Effet de la curcumine sur les marqueurs du stress oxydant au niveau de l'homogénat des reins.

| | **Homogénat des reins** | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **SOD (**U/mg**)** | **CAT (**µmole/min/mg pro**)** | **GSH (**µmol/ mg de prot**)** | **MDA (**nmol/ g de tissu**)** |
| **Contrôle** | 96,25 ± 22,47 | 52,80 ± 1,88 | 7,44 ± 0,34 | 85,19 ± 6,15 |
| **CIA** | 67,16 ± 17,67$^{ns}$ | 46,41 ± 1,98$^{ns}$ | 5,96 ± 0,15*** | 141,98 ± 11,91*** |
| **CIA+Indo** | 133,86 ± 25,6$^{\#}$ | 72,76 ± 7,02$^{\#}$ | 6,84 ± 0,69$^{\#}$ | 99,08 ± 18,93$^{\#}$ |
| **CIA+Cur$^{P}$** | 100,64 ± 31,01$^{ns}$ | 72,671 ± 3,05$^{\#}$ | 6,88 ± 0,44$^{\#}$ | 70,37 ± 18,01$^{\#\#\#}$ |
| **CIA+Cur$^{C}$** | 105,31 ± 21,79$^{ns}$ | 61,51 ± 4,30$^{ns}$ | 6,83 ± 0,23$^{\#}$ | 106,44 ± 10,21$^{ns}$ |

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n=10) ; ** : $p \leq 0.01$, *** $\leq$ 0.001 une différence significative par rapport au groupe Contrôle normal. $^{\#\#\#} \leq 0.001$ une différence significative par rapport au groupe CIA. ns : non significative.

### IV.2.8. Effet inhibiteur sur l'activité de la xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est une enzyme qui est impliquée dans la production des ERO et dans certains processus inflammatoires. L'activité de cette enzyme est évaluée au cours de la PR induite chez le rat, en absence et en présence d'un traitement prophylactique et curatif de la curcumine (110 mg/kg/jour). Les résultats obtenus au niveau de l'homogénat du foie et du rein sont présentés dans le Tableau 8. Ces résultats révèlent que la PR est accompagnée avec une augmentation significative de l'activité de la XO chez les rats CIA, que ce soit dans l'homogénat du foie (0.144 ± 0.023 U/mg de prot) qui présente une augmentation très significative ($p \leq 0.01$) comparée à celui du groupe contrôle normal (0.089 ± 0.009 U/mg de prot), ou même dans l'homogénat du rein (0.149 ± 0.09 U/mg de prot), qui présente également une augmentation hautement significative ($p \leq 0.001$) en comparaison avec les rats sains du groupe contrôle (0.097 ± 0.01 U/mg de prot ).

Le traitement des rats arthritiques par la curcumine, a conduit à une diminution de l'activité de cette enzyme. Dans le foie, le traitement préventif a exercé une diminution hautement significative ($p \leq 0.001$) de l'activité de la XO (0.081 ± 0.02 U/mg de prot), par rapport à son activité chez les rats malades non traités (0.144 ± 0.023 U/mg de prot), tandis que, le traitement curatif par la curcumine et le traitement à l'indométacine, n'ont pas montré un effet sur l'activité de la XO.

Par contre, au niveau de l'homogénat des reins, les traitements prophylactique et curatif de la curcumine (110 mg/kg/jour), et le traitement par le standard ont permis le maintien de l'activité de la XO à son état normale (Tableau 8).

**Tableau 8 :** Effet de la curcumine sur l'activité de la XO.

| | **Homogénat du foie** | **Homogénat des reins** |
|---|---|---|
| | **XO (U/mg)** | |
| **Contrôle** | 0,089 ± 0,009 | 0,097 ± 0,01 |
| **CIA** | 0,144 ± 0,023** | 0,149 ± 0,09*** |
| **CIA+Indo** | 0,106 ± 0,002$^{ns}$ | 0,096 ± 0,04$^{\#\#\#}$ |
| **CIA+Cur$^{P}$** | 0,081 ± 0,02 $^{\#\#\#}$ | 0,091 ± 0,08$^{\#\#\#}$ |
| **CIA+Cur$^{C}$** | 0,105 ± 0,004 $^{ns}$ | 0,094 ± 0,03$^{\#\#\#}$ |

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM, (n=10) ; ** : $p \leq 0.01$, *** ≤ 0.001 une différence significative par rapport au groupe Contrôle normal. $^{\#\#\#} \leq 0.001$une différence significative par rapport au groupe CIA. ns : non significative.

La PR est une maladie auto-immune chronique, caractérisée par un certain nombre d'événements inflammatoires et destructifs tels que le gonflement, les douleurs articulaires, raideur articulaire, déformation et lésions fonctionnelles graves, suite à une destruction du cartilage et de l'os articulaire sous-chondral (Weyand, 2000).

Les avancées réalisées dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques mis en jeu dans le processus inflammatoire de la PR ont conduit au développement de plusieurs thérapies. Trois grandes classes de médicaments sont actuellement disponibles pour le traitement de la PR : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les corticostéroïdes et les traitements de fond encore appelés *disease modifying anti-rheumatic drugs* (DMARD) dont il existe deux groupes : les traitements de fond conventionnels (*synthetic*DMARD) et les biothérapies (*biologic* DMARD) (Carli *et al*., 2009).

Les AINS, comme est le cas de l'indométacine, utilisés seuls n'empêchent pas la progression clinique ni structurale de la maladie, et leur emploi est recommandé en association avec un traitement de fond.

L'indométacine est un puissant anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) aux propriétés anti-inflammatoires, antalgiques et antipyrétiques, généralement utilisée pour traiter l'arthrite inflammatoire chronique (Bourinbaiar et Lee-Huang, 1995). L'indométacine est un dérivé de l'acide indole-acétique portant le nom chimique acide 1- (p-chlorobenzoyl) 25-méthoxy-2-méthylindole-3-acétique (Lucas, 2016). L'effet pharmacologique de l'indométacine résulte de l'inhibition puissante et non sélective de l'enzyme cyclooxygénase (COX), qui est la principale enzyme qui catalyse la biosynthèse des prostaglandines (pro-inflammatoire) et du thromboxane via la voie de l'acide arachidonique (AA) (Hart et boardman, 1963), Comme tous les AINS, l'indométacine peut entraîner certains effets indésirables, notamment des complications gastro-intestinales (ulcère gastroduodénal, hémorragies, perforations), cardiovasculaires, hépatiques (hépatite), rénales, hématologiques, neurologiques et dermatologiques (Lucas, 2016).

D'autre part, l'emploi des corticostéroïdes est limité par les effets indésirables bien connus de toute corticothérapie prolongée (fragilité cutanée, rétention hydrosodée et hypertension artérielle, ….etc) ( Carli *et al*., 2009), les DMARDs, dont le plus utilisé est le méthotrexate, ont également rapidement montré leurs limites en terme d'efficacité et d'effets secondaires (van vollenhoven, 2009; Combe, 2007). Ensuite des thérapies basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux, appelés « Biothérapies », a révolutionné l'arsenal thérpeutique,

dont principalemnt les anti-TNF-α, qui malgré de leur efficacité clinique, ces anticorps ont montré des effets indisirables importants, notamment l'augmentation du risque infectieux (tuberculose) (Gomez-Reino *et al*., 2003). De meme la biothérapie perd son efficacité au cours du traitement à cause de l'apparition d'anticorps dirigés contre les anticorps monoclonaux. Le succès de ces anti-TNF-α mais aussi la non-réaction d'un nombre conséquent de patients à ce traitement a conduit au développement de plusieurs biothérapies ciblant d'autres cytokines inflammatoires impliquées dans la physiopathologie de la PR, et meme ciblant des cellules immunitaires impliquées dans la pathogénie de la PR. L'ensemble de ces thérapies permettent de retarder et même la suppression la destruction articulaire mais aussi d'apporter une meilleure qualité de vie aux patients. Cependant ce type de traitement ne permet pas de guérir la maladie. A cuase que tous ces agents biologiques ciblent une seule cytokine ou une seule molécule de surface qui, est impliqué dans la pathogénie de la PR mais ne régit pas, à elle seule, tout le processus inflammatoire mis en jeu dans cette maladie. (Griffe *et al*., 2007), de même ces thérapies sont inaccessibles pour un grand nombre de malades à travers le monde en raison de leurs cout élevé.

Pour toutes ces raisons, le recours aux produits naturels est toujours d'actualité, ces composés constituent une source de molécules potentiellement actives, au moindre coût et de risques de toxicité relatiffement faible (Hak et Choi, 2008; Sale *et al*., 2008).

La curcumine présente l'un des constituants majeure de l'épice curcuma, elle possède une très vaste gamme des propriétés pharmacologique. De nombreux rapports suggèrent que la curcumine a un potentiel dans le traitement de l'arthrite (Jayaprakasha *et al*., 2005 ; Noorafshan et Ashkani-Esfahani, 2013).

Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle d'arthrite induit par le collagène type II émulsifié avec l'adjuvant complet de Freund lors de la première immunisation et avec l'adjuvant incomplet de Freund dans la deuxième immunisation. Ce modèle d'arthrite est 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).

Les résultats obtenus par notre étude montrent que l'administration préventive et curative de la curcumine à une dose de 110 mg/kg/jour diminue l'évolution et la sévérité de l'arthrite développée par ce modèle. Cette diminution de l'arthrite se manifeste premièrement sur les signes cliniques.

Sans traitement prophyactique, les signes de l'arthrite sont observés à partir le 11$^{ème}$ jour apès la première induction de l'arthrite. C'est le cas des rats du groupe CIA et ceux du groupe ayant reçu un traitment curatif à la curcumine et ce au 14$^{ème}$ jour. L'incidence de la maladie dans ces groupes est haute. Elle atteint 90 % des cas. En revanche, chez les groupes qui ont reçu un traitement prophylactique à la curcumine et à l'indométacine, un retard de l'apparition des signes cliniques de la maladie, avec des incidences inférieures de l'ordre de 80 % et 55.55 %, respectivement ont été remarqués. Les membres postérieurs sont les premiers à être touchés, avec une incidence et sévérité plus élevées par rapport aux pattes antérieurs, qui sont touchées au fur est mesure que l'étude avance. Le nombre moyen des pattes arthritiques chez les rats malades non traités était 3.11 ± 1.16 au 17$^{ème}$ jour, correspondant à l'apparition de la maladie chez tous les rats affectés. Ce nombre est réduit significativement chez les rats traités par l'administration de la curcumine, soit comme traitement prophylactique ou curatif, et de l'indométacine.

Ainsi, le retard de l'apparition de l'arthrite, la diminution du nombre moyen des membres touchés et la faible incidence de l'arthrite chez les rats traité dés le début par la curcumine, révèle en partie l'effet préventif efficace de cette substance, par contre la diminution de ces paramètres chez le groupe curatif, révèle à son tour l'effet thérapeutique probable de la curcumine vis-à-vis l'arthrite, cet effet est probablement dû à l'effet anti-inflammatoire important de la curcumine, notamment vis-à-vis les médiateurs pro-inflammatoires tel que le TNF-α, l'IL1β, ou même via l'inhibition de l'activation de NFκB (Goel *et al*., 2008 ; Abe *et al*., 1999, Surh *et al*. 2001).

Le gonflement articulaire est du à l'inflammation de la membrane synoviale. Cette membrane s'épaissit, puis laisse suinter du liquide et certains éléments du sang (notamment les leucocytes) dans l'articulation, l'effet anti-inflammatoire d'une substance va se traduire par la diminution des symptômes inflammatoires, dont le gonflement.
Le groupe CIA, n'ayant reçu aucun traitement, a présenté un gonflement important. Par contre, chez les rats traités avec la curcumine et l'indométacine, on remarque une

diminution important de ce symptôme inflammatoire, dû probablement aux effets anti-inflammatoires des ces deux molécules.

La perte du poids est l'un des symptômes caractéristiques de la PR (Lee *et al*, 2001). Le poids corporel des rats CIA et des rats ayant reçus un traitement curatif, diminue progressivement après trois semaines d'immunisation. Le poids est significativement très bas le dernier jour d'étude chez les rats CIA par rapport au groupe des rats sains, ce qui s'explique par la difficulté de déplacement des rats vers la nourriture, à cause d'une inflammation sévère des pattes, s'accompagnant avec un gonflement, rougeur, et douleurs, en plus que ces pattes deviennet ankylosées les derniers jours.

Notre étude a montré que le traitement préventif de la curcumine, a maintenu une croissance normale du poids corporel au cours des 40 jours d'étude, qui ne diffère pas significativement à celui du début de l'étude et du standard l'indométacine et de celui des rats sains.

Un taux élevé des leucocytes joue un rôle majeur dans le mécanisme de défense de l'organisme (Kumar *et al*., 2004). Elle implique la production d'un plus grand nombre de globules blancs tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les monocytes et les neutrophiles. Toutes ces cellules ont leur propre rôle important dans une réaction inflammatoire (Antony *et al*., 1999). Certains facteurs ou protéines produits pendant cette réaction, comme les cytokines inflammatoires, peuvent favoriser la maturité et l'activation des leucocytes, en particulier celles qui participent à la réponse immunitaire à médiation cellulaire (VanderBorght *et al*., 2001). La réponse inflammatoire à l'arthrite induite par le CII entraîne une augmentation du nombre de ces cellules, par contre la supplémentation en indométacine ou en curcumine, soit dans le cas curatif ou prophylactique, a maintenu un taux normale des leucocytes en comparaison avec les rats sains, on suggère que la curcumine exerce ses effets anti-inflammatoires dans le cas de CIA, en inhibant des médiateurs inflammatoires et par conséquent réduire la prolifération de leucocytes et donc diminuer le nombre total de ces derniers. Ces résultats sont en accord avec une recherche antérieure qui confirme que le traitement à la curcumine réduit la prolifération des lymphocytes suite à l'action inductive de l'IL-2 (Ranjan *et al*., 2004).

Les changements radiographiques des articulations dans les conditions de la PR sont des indications qui précisent la gravité de la maladie. L'enflure des tissus mous est le signe radiographique le plus précoce, alors que des changements radiographiques importants comme les érosions osseuses et le pincement de l'interligne articulaire ne peuvent être

observés qu'aux stades développés de l'arthrite (Harris, 1990 ; Sokka, 2008). Les caractéristiques radiographiques des articulations observées chez les rats souffrants d'arthrite sans aucun traitement (groupe CIA), montrent une progression significative ($p \leq 0.001$) de gonflement des tissus mous et un pincement important des espaces articulaires, ce qui implique une destruction osseuse grave. Le groupe recevant la curcumine à la dose de 110 mg/kg/jour, à titre préventif, a montré une prévention significative ($p \leq 0.001$) contre la destruction osseuse. L'examen radiologique dans ce groupe montre moins de pincement des espaces articulaires, et absence d'œdème des tissus mous en comparaison avec le groupe CIA.

Les scores radiologiques des rats CIA traités à l'indométacine (CIA+Indo) étaient significativement plus faibles ($p \leq 0.001$) que ceux des rats CIA sans aucun traitement. De même, un supplément prophylactique (40 jours) ou curatif (pendant 26 jours) de curcumine ont diminué significativement ($p \leq 0.001$, $p \leq 0.05$, respectivement) les scores radiologiques par rapport aux rats témoins arthritique, ce qu'il révèle que la curcumine est capable d'arrêter et de réduire les érosions et le pincement articulaires. Cet effet radiologique est en accord avec les résultats d'une étude rapportée par Zahidah et ses collaborateurs (2012). Les métalloprotéinases de la matrice sont responsables des caractéristiques pathologiques de la PR telles que la dégradation du cartilage (Liacini *et al*. 2002), avec ses effets anti-inflammatoires, il est probable que la curcumine diminue la destruction des structures articulaires, via l'influence sur la production et l'activité des métalloprotéinases.

L'inflammation articulaire de la polyarthrite rhumatoïde commence dans la synoviale et produit au cours du temps une synovite rhumatoïde. Au stade précoce, des changements inflammatoires aigus ont été observés, rapidement remplacés par une inflammation chronique avec une caractéristique dominante prolifération et infiltrante (Tak, 2000 ; Baeten *et al*., 1999 ). Les principales altérations morphologiques de la synovite rhumatoïde sont: exsudation, infiltration cellulaire inflammatoire, prolifération cellulaire et formation de tissu granulomateux (pannus), ce qui peut aboutir à des lésions du cartilage et de l'os (Youssef *et al*., 1998). Les lymphocytes sont la principale population cellulaire, ils représentent environ 70 à 80 %, dont 92 % sont des lymphocytes T auxiliaires $CD4^+$ et 8 % des lymphocytes T cytotoxique $CD8^+$. Initialement, ils ont une disposition diffuse ou nodulaire et plus tard dans les follicules avec centres germinatifs. Les macrophages qui sont responsables au traitement des antigènes et à la phagocytose des complexes immuns

ne représentent que 5 à 10 % des cellules inflammatoires (Tak, 2000 ; Baeten *et al*., 1999 ). La formation de tissu granulomateux (pannus) consiste en: une néoangiogenèse étendue qui augmente l'infiltration leucocytaire, une prolifération fibroblastique stromale, un infiltrat inflammatoire. Cette étape est cruciale pour la progression de la maladie, car elle est à l'origine des érosions des structures adjacentes qui produisent finalement la destruction articulaire (Veale, 1999). Un infiltrat leucocytaire massif, et une augmentation de la prolifération des fibroblastes, s'accompagne par une production accrue des cytokines pro-inflmmatoires. Il est de plus en plus évident que les fibroblastes synoviaux ont un rôle pathogène dans la PR. Non seulement ils répondent aux acteurs produits par les lymphocytes et les macrophages de l'articulation (tels que l'IFN-γ, le TNF-α et l'IL-17), mais en plus ils produisent de nombreux facteurs auxquels ils répondent par boucle autocrine **(**Firestein *et al*., 1990 **;** Saxne *et al*., 1988**).** Il en résulte une modification dans l'expression des gènes régulateurs, des molécules de signalisation, des molécules d'adhésion et une surexpression des enzymes de dégradation de la matrice, telles que les métalloprotéases matricielles (MMPs), notamment le MMP-3, qui contribuent à la destruction du cartilage (Kageyama *et al*., 2000). Plusieurs études ont montré que ces cellules sont les plus prédominantes pour la sécrétion de RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), dans la synovite, qui sont des molécules responsables de l'ostéoporose et la destruction de l'os (Cui *et al*., 2019).

Dans cette étude, les coupes histologiques des rats arthritiques sont caractérisées par tous ces changements de la morphologie articulaire, avec une sévérité importante, et un score histologique hautement significatif ($p \leq 0.001$) par rapport à l'architecture articulaire des coupes histologique de celles des rats sains (Figure 31 et 32).

Le traitement prophylactique de la curcumine a montré une prévention significative de l'architecture histologique de l'articulation, avec une diminution de l'infiltration cellulaire et de la formation du pannus, et par conséquence diminution d'érosion d'os et du cartilage.

La suppression de l'infiltration cellulaire par la curcumine dans notre étude est supportée par les résultats de recherches antérieures qui indiquaient que la curcumine pouvait réduire l'expression des molécules d'adhésion à la surface des monocytes (Seemayer *et al*., 2005). Cela empêche l'adhésion du facteur d'activation des monocytes et par conséquent diminue les effets inflammatoires des monocytes dans les articulations. De plus, ces monocytes inactifs ne peuvent pas produire de cytokines pro-inflammatoires ou d'autres chimiokines

qui pourraient attirer d'autres cellules inflammatoires dans le foyer inflammatoire articulaire.

A partir les différentes étapes citées du changement morphologique des articulations, on peut déduire que la curcumine exerce ses effets préventifs et thérapeutiques au niveau des premières étapes, avant la formation du pannus qui considéré le stage crucial de la destruction de l'articulation et qui s'accompagne obligatoirement par la destruction du cartilage et de l'os. Cet effet est peut être dû à l'effet anti inflammatoire important de la curcumine, via l'inhibition des molécules pro-inflammatoire, tels que le TNF- α et IL-1β (Yılmaz Savcun *et al*., 2013 ; Chen *et al*.**,** 2017), l'inhibition de l'activation NFκB (Surh *et al*. 2001) et même via la répression de la production de BAFF (B-cell activating factor) via la diminution de l'IFNγ et de l'IL-6 sériques, qui pourrait être considéré comme un nouveau mécanisme pour diminué la sévérité de la PR (Huang *et al*., 2013).

Earp et ses collaborateurs (2008) ont également montré une diminution des symptômes arthritiques grace à la supplémentation en curcumine, via la réduction de la formation de nouveaux capillaires sanguins (angiogenèse). Une recherche antérieure réalisée par Aggarwal et ses collaborateurs (2005) a montré, de sa part, que la curcumine pouvait réduire l'expression des gènes liés à l'angiogenèse, du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et de la métalloprotéinase matricielle-9 (MMP-9) qui réduisaient la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Cet effet inhibiteur d'angiogenèse de la curcumine explique en partie la diminution de la formation de pannus, via l'inhibition de la formation des nouveaux capillaires sanguins faisant partie du pannus, Cette étape est cruciale lors de la destruction des articulations arthritiques (Veale, 1999). Une étude récente réalisée par Dou et ses collaborateurs (2018), a montré que la curcumine supprimait la réponse inflammatoire et atténuait la CIA en ciblant «l'axe intestin-cerveau».

D'autre part, la présente étude a indiqué que la maladie de PR s'accompagne avec un stress oxydatif au niveau tissulaire, foie et reins, qui se produit en raison d'un déséquilibre entre les systèmes oxydant-antioxydant, ce déséquilibre pourrait être dû à la génération élevée de radicaux libres, par les cellules impliquées dans l'inflammation dans les articulations, principalement par les cellules phagocytaires, ou même par les cellules endothéliales, les fibroblastes, et les chondrocytes, et/ou dû à l'activité réduite des antioxydants (Hitchon et El-Gabalawy, 2004).

Chez les rats arthritiques, une augmentation du taux du MDA a été remarquée dans le tissu du foie et les reins. L'augmentation de ce marqueur de la peroxydation lipidique, est associée à la production accrue des ERO, qui ne sont pas neutralisés, et cela peut donc être lié à un potentiel antioxydant insuffisant ou épuisé.

Le glutathion, un tripeptides, est le majeur antioxydant non-enzymatique intracellulaire (Morimoto *et al*., 2008). Il offre la protection contre les radicaux libres, les peroxydes et les composés toxiques (Meister , 1994). La diminution du taux de GSH tissulaire chez les rats arthritiques peut être expliquée par l'épuisement de ce peptide et l'altération du système de sa synthèse lors de la génération élevée des ERO au cours de l'inflammation des articulations.

La CAT, qui agit comme antioxydant enzymatique préventif, élimine le peroxyde d'hydrogène par la transformation de ce dernier à une molécule d'eau et d'oxygène. La SOD, qui est un antioxydant, attaque l'anion superoxyde et le converti en peroxyde d'hydrogène pour arrêter les réactions en chaîne, mais cette activité de la SOD n'est efficace que lorsqu'elle est suivie par les actions de CAT, car l'activité de dismutation de la SOD génère du peroxyde d'hydrogène, qui est plus toxique que les radicaux libres dérivés de l'oxygène et doit être neutralisé par la CAT (Blake *et al*., 1987). Ces deux enzymes jouent un rôle important dans la protection contre les effets délétères des ERO et donc de la peroxydation lipidique (Ray et Husain, 2002). En effet, la CAT et la SOD représentent la première ligne de défense dans la neutralisation des ERO endogènes, à travers laquelle les cellules tentent de maintenir des quantités plus faibles d'$O_2^{\cdot -}$ et $H_2O_2$ et évitent ainsi la formation du radical hydroxyl $OH^{\cdot}$ qui est, même à très faibles concentrations, extrêmement réactif et endommage les cellules (Halliwell et Gutteridge, 1999).

Dans le présent travail l'étude de l'activité du SOD et de CAT dans le foie, et les reins au cours de la PR, a montré une diminution remarquable de cette activité chez les rats arthritiques non traités par rapport aux rats sains.

La curcumine est considérée comme l'un des meilleurs agents antioxydants (Farkhondeh *et al*., 2016) en piégeant ou en neutralisant les radicaux libres, en interagissant avec la cascade oxydative, en inhibant les enzymes oxydantes comme le cytochrome $P^{450}$ et en chélatant les ions métalliques comme $Fe^{2+}$. La curcumine favorise ainsi la détoxification non enzymatique des radicaux libres, inhibant la peroxydation des lipides membranaires et

maintient l'intégrité de la membrane cellulaire et ses fonctions (Balasubramanyam *et al*., 2003, Pulla Reddy et Lokesh 1994).

Dans la présente étude, les dommages oxydatifs tissulaires enregistrés chez les rats souffrants de PR, pourraient être améliorés par un traitement par la curcumine. Nos résultats montrent que la curcumine a des effets bénéfiques contre ces dommages du stress oxydatif dans les organes vitaux (foie et reins), soutenant l'hypothèse que les produits végétaux sont des agents antioxydants efficaces.

Le taux du GSH au cours de l'arthrite est significativement restauré, et augmenté chez les rats traité avec la curcumine. Cette amélioration du taux du GSH pourrait être expliquée par la favorisation de sa synthèse ou par l'améliorisation de l'activité du glutathione réductase en présence de la curcumine. L'augmentation de la teneur en GSH par la curcumine peut maintenir l'intégrité et la stabilité de la membrane et favoriser la détoxification non enzymatique des radicaux hydroxyles (Yousef *et al*., 2010), réduire considérablement l'initiation de la peroxydation lipidique dans le foie, et les reins, ce qui explique la diminution du taux du MDA chez les rats traités par la curcumine.

L'administration de la curcumine chez des rats arthritiques, maintient et favorise efficacement l'activité de SOD et de CAT dans le foie et les reins, et ceci peut s'expliquer par l'effet scavenger de la curcumine vis-à-vis des radicaux libres, notamment l'anion superoxyde et par conséquent le peroxyde d'hydrogène. Aussi, l'effet peut s'expliquer par l'inhibition de la XO et donc la diminution de la génération de l''$O_2^{\cdot -}$.

Plusieurs autres études ont montré l'effet antioxydant important de la curcumine *in vivo*, dans différents cas pathologiques et au niveau de différents tissus. Samarghandianet et ses collaborateurs (2017) ont montré que la curcumine peut prévenir les dommages oxydatifs induits par le stress de contrainte (restraint stress–induced) dans le cerveau, le foie et les reins des rats. Naik et ses collaborateurs (2011) ont montré l'effet antioxidant efficace de la cucumine chez des rats dans le cas d'inflammation, d'hépatotoxicité, et de cardiotoxicité, au niveau du tissu oedémateux, granulomateux, du foie et du tissu cardiaque. Kalpana et Menon (2004) ont investigué l'effet important de la curcumine sur la diminution de du taux de la peroxydation lipidique et la favorisation du statut antioxydant chez des rats induits par la nicotine, le majeur composé de la cigarette, au niveau du tissu hépatique, rénale, et pulmonaire. Dans une autre étude réalisée par Motaghinejad et ses collaborateurs (2014), les auteurs ont confirmé cet effet de la curcumine au niveau de tissu cervical,

l'hippocampe, chez des rats traités avec la morphine, qui est un antalgique et utilisé dans l'étude pour provoquer une neurotixicité. Cao et ses collaborateus (2015) ont montré l'effet antioxydant de la curcumine dans le foie des poissons, type Jian carpe, souffrants de l'hépatotoxicité induite par la $CCL_4$. . Une augmentation de la capacité antioxydant dans le sérum et le tissu rénal chez des souris traitées par l'arsénite, polluants environnemental, a été également démontrée par Momeni, et ses collaborateurs (2016).

Ainsi, à partir nos résultats,on déduit que la curcumine exerce son effet protecteur contre la toxicité des ERO produites au cours de la PR, en piégeant ou en neutralisant les radicaux libres, inhibant ainsi l'initiation de la peroxydation lipidique et en favorisant le système de défense antioxydant : GSH**,** CAT, et SOD.

D'autre part, Les résultats d'estimation de l'activité de Xanthine oxydase (XO) montrent que l'activité de cet enzyme au niveau tissulaire, foie et reins, dans le cas de l'arthrite est augmentée, bien que la distribution de la XO est prépondérante dans le foie (Harrison, 2002). Des travaux antérieurs ont localisé l'enzyme dans la membrane synoviale (Benboubetra *et al*., 1997). Une recherche a été faite par Hanachi et ses collaborateurs (2008), sur la présence de la XOR dans la membrane synoviale chez des patients atteints par la PR et d'autres patients atteints d'autres pathologies articulaires (non PR). Les résultats obtenus par cette recherche révèlent la présence de cette enzyme dans la membrane synoviale, dont 50 % de cette enzyme est de forme XO. Une corrélation significativement positive a été également observée entre le niveau enzymatique (XO) et la sévérité de la maladie (PR), car les patients atteints de PR avaient une quantité d'enzyme significativement élevée par rapport aux patients présentant d'autres pathologies articulaires**.** Ceci est expliqué par le fait qu'au cours de l'inflammation, les différents médiateurs inflammatoires, comme le TNF-α, activent la XOR, et provoquent la conversion de la XDH en XO (Batteli *et al*., 2014).

Ces résultats suggèrent que l'enzyme pourrait bien être impliquée dans l'inflammation articulaire probablement en produisant des espèces réactives de l'oxygène, ou même par la production accrue des cristaux de l'acide urique et compliquait ainsi la maladie de la PR.

A notre connaissance, il n'y aucune étude qui a démontrer l'effet inhibiteur de la curcumine vis-à-vis de la XO, au cours de la pathologie de polyarthrite rhumatoïde. Les résultats que nous avons obtenus montrent l'effet de la curcumine sur l'activité de cette enzyme, où le traitement par la curcumine a maintenu l'activité de cette enzyme à sont état normal, ce qui peut diminuer son effet aggravant la PR par la produition des ERO.

## Conclusion et perspectives

L'objectif primordial assigné par ce travail était d'évaluer l'effet de la curcumine sur le stress oxydant et sur l'inflammation dans le cas d'une maladie inflammatoire compliquée, la polyarthrite rhumatoide.

Dans un premier temps, l'activité antioxydante de la curcumine a été évaluée d'abord *in vitro,* en utilisant différentes méthodes afin de vérifier la capacité antioxydante de cette molécule. Pour cela, on a estimé l'activité scavenger de la curcumine vis-à-vis des radicaux libres, en utilisant le test GOR, ABTS, et $OH^{\cdot}$, qui reflètent la capacité à transférer d'atome d'hydrogène (HAT, hydrogen atom transfer). D'autre part on a estimé la capacité réductrice, en utilisant la méthode du pouvoir réducteur, du CUPRC, et de O-phenanthroline, qui reflètent la capacité à transférer des électrons (ET, electons trensfer). Ces différents tests montrent l'effet antioxydant primaire, tandis que l'effet antioxydant secondaire (préventif) a été déterminé par le test de chélation du fer ferreux. Les résultants obtenus par l'ensemble de ces essais montrent que la curcumine est un excellent antioxydant primaire et un bon antioxydant secondaire naturel.
L'étude de l'effet anti-inflammatoire et l'effet inhibiteur de la curcumine vis-à-vis de la XO *in vitro* montre que la curcumine est un excellent inhibiteur de la XO.

Ces essais effectués *in vitro* ont été suivis par une étude *in vivo*, dans le cas de la PR, sur des rats induits au collagène-II, l'évaluation de l'effet préventif et curatif de la curcumine (110 mg/kg), a manifesté une efficacité considérable sur la sévérité de l'état inflammatoire témoigné par un retard dans l'apparition de la maladie, une réduction des signes cliniques, révélée par l'etude hématologique, histopathologique et radiologique, par un maintien des paramètres hématologiques stables, et par la prévention et la diminution des dommages articulaires. De même, la curcumine a montré une amélioration du statut des marqueurs du stress oxydatif (GSH, CAT, SOD, MDA) et même de l'état de la XO, au niveau tissulaire.

A la lumière de ces résultats, on peut conclure et supporter des études antérieures que la curcumine est un excellent anti-inflammatoire et antioxydant de source naturelle.

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

- L'amélioration de la biodisponibilité de la curcumine, le problème qui diminuer l'efficacité de cette molécule.

- Détermination des mécanismes par lesquels la curcumine exerce ses effets ani-inflammatoire et anti-oxydants.
- Evaluation de l'effet de la curcumine sur les médiateurs clefs de l'inflammation, les deux cytokines pro-inflammatoires TNF-α , IL-1 et les voies de signalisation dans les tissus articlaires.

# *Références Bibliographiques*

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

Abe Y, Hashimoto S, Horie T (1999). Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacol Res*. 39:41- 47.

Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105: 121- 126.

Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Revue du Rhumatisme*. 74:636–643.

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003). Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of Biological Chemistry*. 278: 1910-1914.

Aggarwal B.B, Kumar A, Bharti A.C (2003). Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer. Res.* 23:363-398.

Aggarwal BB, Kumar A, Aggarwal MS, Shishodia S (2005). Curcumin derived from turmeric (*Curcuma longa*): A spice for all seasons. In: Preuss H (ed.): Phytochemicals in cancer chemoprevention (pp 349-87). New York: CRC Press.

Aggrawal B.B, Sung B (2009). Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 30(2): 85 – 94.

Aggarwal B.B, Harikumar K.B (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 41: 40–59.

Ak T, Gülçin I (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem.-Biol. Interact*. 174: 27–37.

Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA (2006). Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*.36: 182-8.

Allen R.E, Blake D.R, Nazhat N.B, Jones P. (1989). Superoxide radical generation by inflamed human synovium after hypoxia. *Lancet.* 2:282-3.

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

Anand P, Kunnumakkara A.B, Newman R.A, Aggrawal B.B (2007). Bioavailibility of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* 4(6): 807 – 818

Ammon H, Safayhi H, Mack T, Sabieraj j (1993). Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and boswellic acids. *J Ethnopharmacol*. 38:113-119.

Anto R.J, George J, Babu K.V, Rajasekharan K.N, Kuttan R (1996). Antimutagenic and anticarcinogenic activity of natural and synthetic curcuminoids. *Mutat. Res.* 370: 127-131.

Antony S, Kuttan R, Kuttan G (1999). Immuno-modulatory activity of curcumin. *Immunol Invest*. 28:291-303.

Apak R, Guclu¨ K, Ozyurek M, Karademir S. E (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food Chem.*52: 7970–7981.

Apak R, Özyürek M, Guclu K, Capanoglu E (2016). Antioxidant activity/capacity measurement: I. Classification, physicochemical principles, mechanisms and electron transfer (ET)-based assays. *J. Agric. Food Chem.* 64(5): 997-1027.

Apisariyakul A, Vanittanakom N, Buddhasukh D (1995). Antifungal activity of tumeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J Ethnopharmacol*. 49:163–169.

Araujo C.A.C, LEON L.L (2001). Biological activities of Curcuma longa L. *Mem. I. Oswaldo Cruz*. 96(5): 723 – 728.

Arora R.B, Kapoor V, Basu N, Jain A.P (1971). Antiinflammatory studies on Curcuma longa [turmeric]. *Indian J. Med. Res.* 59:1289-1295.

Artiss JD, Vinogradov S, Zak B (1981). Spectrophotometric study of several sensitive reagents for serum iron. *Clin Biochem*. 14: 311-15.

Asmus KD, Bonifacic M (2000). Free radical chemistry. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. Amsterdam: Elsevier; p. 3–53.Asouri M, Ataee R, Ahmadi A. A, Amini A, Moshaei M.R (2013). Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Curcumin. *Asian J. Chem*. 25(13): 7593-7595.

**B**aclé 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 a l'officine. Thèse de docteur en pharmacie. Université de Rouen, France.

Baeten D, Van Den Bosch F, Elewaut D, Stuer A, Veys E.M, De Keyser F *(*1999). Needle arthroscopy of the knee with synovial biopsy sampling: technical experience in 150 patients. *Clin Rheumatol*. 18:434-441.

Bahorun T, Soobrattee MA, Luximon-Ramma V, Aruoma OI (2006). Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet J. Med. Update*.1: 1-17.

Baillet A, Gaujoux-Viala C, Mouterde G, Pham T, Tebib J, Saraux A, Fautrel B, Cantagrel A, Le Loet X, and Gaudin P (2011). Comparison of the efficacy of sonography, magnetic resonance imaging and conventional radiography for the detection of bone erosions in rheumatoid arthritis patients: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology (Oxford).* 50:1137-47.

Balasubramanyam M, Koteswari AA, Kumar RS, Monickaraj SF, Maheswari JU, Mohan V(2003). Curcumininduced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. *J Biosci*. 28: 715–721.

Balasubramanian K (2006). Molecular Orbital Basis for Yellow Curry Spice Curcumin'S Prevention of Alzheimer'S Disease. *J. Agric. Food Chem.54* (10):3512–3520.

Barik A, Mishra B, Shen L, Mohan H, Kadam R.M, Dutta S, Zhang HY, Priyadarsini KI (2005). Evaluation of a new copper[II]-curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions. *Free Radic. Biol. Med.* 39: 811-822.

Barja G (2004). Free radicals and aging. *TRENDS in Neurosciences*. 27: 595-600.

Barouki R (2006). Stress oxydant et vieillissement. *Medcine/ Sciences.* 22 : 266-272.

Battelli MG, Polito L, Bolognesi A (2014). Xanthine oxidoreductase in atherosclerosis pathogenesis: Not only oxidative stress. *Atherosclerosis.* 237: 562-567.

Battelli M.G, Bortolotti M, Polito L, Bolognesi A (2018). The role of xanthine oxidoreductase and uric acid in metabolic syndrome. *BBA - Mol Basis Dis*. 1864: 2557–2565.

Beaudeux J.-L, Delattre J, Therond P, Bonnefont-Rousselot D. Legrand A. Peynet J (2006). Oxidative stress in the atherosclerotic process. *Immuno-Anal Biol Spe*. 21 :144–150

Beavis PA, Gregory B, Green P et al (2011). Resistance to regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis can be bypassed by ectopic foxp3 expression in pathogenic synovial T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.108:16717-22.

Beckman JS (2001). –ONOO. Rebounding from nitric oxide. *Circ Res.* 89: 295–7.

Benboubetra M, Arrar L, Hanachi N, Baghiani A (2001). Xanthine oxidoreductase activity in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem. Soc. Trans*. 29(5): A110.

Bennamara F-Z (2017). Stress oxydant Et pathologies humaines. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohammed V-Rabat, Rabat, Maroc.

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

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

Berger M.M (1997). Role antioxidant des micronutriments: pertinence en épidémiologie et réanimation. *Nutrition clinique et metabolism*. 11:125-32.

Berger M.M (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances, Nutritional manipulation of oxidative stress: review of the evidence. *Nutr Clin Metab*. 20: 48–53.

Berglin E, Kokkonen H, Einarsdottir E, Agren A, Rantapaa Dahlqvist S (2010). Influence of female hormonal factors, in relation to autoantibodies and genetic markers, on the development of rheumatoid arthritis in northern Sweden: a case-control study. *Scand J Rheumatol*. 39:454-60.

Bergmeyer H.I, Gawehn K, Grassl M (1974). Methods of Enzymatic analysis. H.U Bergmeyer, Ed., 2nd edition., Volume I, 521-522, Academic Press Inc., New York, NY.

Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol*. 19: 652-657.

Bharti AC, Donato N, Aggarwal BB (2003). Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells. *J Immunol*. 171: 3863–71.

Bjorneboe A, Bjorneboe GA, Drevon CA (1990). Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J Nutr.* 120:233-242.

Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, Maitra A (2007). Polymeric nanoparticleencapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnol*. 5:3.

Bisset NG (1994), ed. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press.

Blake D.R, Allen R.E, Lunec J (1987). Free radicals in biological systems? a review orientated to inflammatory processes. *Br. Med. Bull*. 43 (2): 371–385.

Blake D.R, Merry P, Unsworth J, Kidd B.L, Outhwaite J.M, Ballard R, Morris C.J, Gray L, Lunec J (1989). Hypoxic-reperfusion injury in the inflamed human joint. *Lancet.* 1:289-93.

Bong P. H (2000). Spectral and photophysical behaviours of curcumin and curcuminoids. *Bull Korean Chem Soc*. 21: 81-86.

Bonnefont-Rousselot D, Peynet J, Beaudeux J-L, Thérond P, Legrand A, Delattre J (2002). Oxidative stress, vascular function and atherosclerosis. *Nutr Clin Metab*. 16: 260–267.

Bonnefont-Rousselot D, Beaudeux J, Thérond P, Peynet J, Legrand A, Delattre J (2004). Diabète sucré, stress oxydant et produits de glycation avancée. *Ann Pharm Fr*. 62: 147-157.

Bonnefont-Rousselot D (2007). Stress oxydant et vieillissement. *SPECTRA BIOLOGIE*. 157: 23-26.

Bonnefont-Rousselota D, Collin F (2010). Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. *Toxicology*. 278:55–67.

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

Bourinbaiar A.S, Lee-Huang S (1995). The non-steroidal anti-inflammatory drug, indomethacin, as an inhibitor of HIV replication. *FEBS Letters.* 360 (1995) 85-48.

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

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

Burger D, Rezzonico R, Li JM, Modoux C, Pierce RA, Welgus HG, et al (1998). Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis Rheum*. 41:1748–1759.

Burgos-Vargas R, Catoggio L.J, Galarza-Maldonado C, Ostojich K, Cardiel M.H (2013). Current Therapies in Rheumatoid Arthritis: A Latin American Perspective. *Reumatol Clin*. 9(2):106-112.

Burman AC, Haworth O, Bradfield P, Parsonage G, Filer A, Thomas A, Amft N, Salmon M, Buckley C.D (2005). Rôle des interactions entre cellules stromales et

leucocytaires dans les maladies articulaires inflammatoires chroniques. *Rev. du Rhum.* 72:10–16.

**C**amacho-Barquero L, Villegas I, Sanchez-Calvo J.M, Talero E, Sanchez-Fidalgo S., Motivla V. Motilva V, Alarcón de la Lastra C (2007). Curcumin, a Curcuma longa constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int. Immunol.* 7(3): 333 – 342.

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

Cao L, Ding W, Du J, Jia R, Liu Y, Zhao C, Shen Y, Yin G (2015). Effects of curcumin on antioxidative activities and cytokine production in Jian carp (Cyprinus carpio var. Jian) with CCl4-induced liver damage. Fish Shellfish Immun. 43:150-157.

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

Carbonell J, Cobo T, Balsa A, Descalzo M.Á, Carmona L (2008). The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology*. 47(7): 1088-1092.

Carli P, Landais C, Aletti M, Cournac J.-M, Poisnel E, Paris J.-F (2009). Traitement actuel de la polyarthrite rhumatoïde. *Rev. Med. Interne.* 30: 1067–1079.

Carmona L, Gonzalez-Alvaro I, Balsa A, Angel Belmonte M, Tena X, Sanmarti R (2003), Rheumatoid arthritis in Spain: occurrence of extra-articular manifestations and estimates of disease severity. *Ann Rheum Dis.* 62:897-900.

Cerhan J.R, Saag K.G, Merlino L.A, Mikuls T.R, Criswell L.A. (2003), Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women. *Am J Epidemiol* .157:345-54.

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

Chai H.S ,Yan lin A.B, Lumseden Q.Yao, Chen C (2005). Curcumin blocks HIV protease inhibitor ritonavir induced vascular dysfunction in porcine coronary arteries. *J.Am coll.Surg.*200:820-30.

Chainani-Wu N (2003). Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med* 9: 161–168.

Chan M.M, Huang H.I, Fenton M.R, Fong D (1998). In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem. Pharmacol.* 55:1955-1962.

Cheema G.S, Roschke V, Hilbert D.M, Stohl W (2001). Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* .44: 1313- 1319.

Cheikh Ali Z (2012). Études chimiques et biologiques d'*Aframomum sceptrum* (Zingiberaceae) et de la Curcumine. Thèse de Doctorat. Université de Paris Sud. France.

Chen Y.R., Tan T.H. – Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase [JNK] signaling pathway by curcumin. *Oncogene* 1998, 17, 173-178.Changyi CH, Jian-Ming L, Qizhi Y (2016). Hyperuricemia-Related Diseases and Xanthine Oxidoreductase (XOR) Inhibitors: An Overview. *Med Sci Monit*. 22: 2501-2512.

Chen L, Liu T, Wang Q, Liu J (2017). Anti-inflammatory effect of combined tetramethylpyrazine, resveratrol and curcumin *in vivo*. *BMC Complement Altern Med* . 17:233.

Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, Hsu MM, Ho YF, Shen TS, Ko JY, Lin JT, Lin BR, Ming-Shiang W, Yu HS, Jee SH, Chen GS, Chen TM, Chen CA, Lai MK, Pu YS, Pan MH, Wang YJ, Tsai CC, Hsieh CY (2001). Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 21: 2895–2900.

Cimen MYB, Cimen OB, Kacmaz M, Ozturk HS, Yorgancioglu R, Durak I (2000). Oxudant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthrisis. *Clin Rheumatol*.19:275-7.

Cimmino M.A, Salvarani C, Macchioni P, Montecucco C, Fossaluzza V, Mascia M.T, Punzi L, Davoli C, Filippini D, Numo R (2000). Extra-articular manifestations in 587 Italian patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 19:213-7.

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

Combe B (2007). Early rheumatoid arthritis: strategies for prevention and management. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 21: 27-42.

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

Contis A, Kostine M, Richez C (2014). Le polynucleaire neutrophile dans la polyarthrite rhumatoide : une cellule oubliee ? *Neutrophils in rheumatoid arthritis: a forgotten cell?. La Lettre du Rhumatologue*. 407 : 12-15.

Cui M.Y, Li X, Lei Y.M, Xia L.P, L J, Shen H (2019). Effects of IL-34 on the secretion of RANKL/OPG by fibroblast-like synoviocytes and peripheral blood mononuclear cells in rheumatoid arthritis. *Eur. Cytokine Netw.* 30(2): 67-73.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Britti D, Maio M.D, Caputi A.P (2001). Absence of endogeneous interleukin-10 enhances the evolution of murine type II Collagen-Induced Arthritis. *Eur. Cytokine Netw.* 12(4): 568-580.

**D**ai L, Lamb D.J, Leake D.S, Kus M.L, Jones H.W, Morris C.J, Winyard P.G (2000). Evidence for oxidised low density lipoprotein in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients. *Free Radic Res.* 32:479-86.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 329:23-38.

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

Davies KJ (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 50(4-5):279–89.

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

De Pablo P, Dietrich T, McAlindon T.E (2008). Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol*. 35(1):70-76.

Dean RT, Roberts CR, Forni LG (1984). Oxygen-centreted free radical scan efficiencly degrade the polypeptide of proteoglycans in whole cartilage. *Biosci Rep*. 4:1017-1026.Delattre J, Beaudeux J.L, Bonnefont-Rousselot D (2005). Stress oxydant, stress nitrosant et pathologies articulaires. In : Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques. Edt Tec Doc. Paris : Lavoisier. pp: 501-510.

Deby-Dupont G, Deby C, Lamy M (2002). Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. *Réanimation*. 11: 28-39.

Decker E. A, Welch B (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.* 38: 674–677.

Defeng W. Cederbaum A.I (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health*. 27: 277-284 .

Del Carlo M.Jr, Loeser R.F (2002). Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum.* 46:394-403.

Delattre J, Beaudeux J.L, Bonnefont- Rousselot D (2005). Antioxydants et nutrition. In : Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques. Edt Tec Doc. Paris : Lavoisier. pp: 261-276.

Delattre J, Beaudeux J.L, Bonnefont- Rousselot D (2005). Systèmes antioxydants endogènes. In Radicaux libres et stress oxydant, Aspects biologiques et pathologiques. Edt Tec Doc. Paris : Lavoisier. pp: 87-108.

Deodhar SD, Sethi R, Srimal RC (1980). Preliminary study on antirheumatic activity of curcumin (diferuloyl methane). *Indian J Med Res.* 71: 632–634.

Dewar CL, Harth M (1994). Superoxide production from cytokine-treated adherent rheumatoid neutrophils. *Clin Invest Med*.17: 52-60.

Ding L, Liu Z, Zhu Z, Luo G, Zhao D, Ni J (1998). Biochemical characterization of selenium-containing catalytic antibody as a cytosolic glutathione peroxidase mimic. *Biochem J*. 332 ( Pt 1):251–5.

Dorner T, Burmester GR (2003). The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets. *Curr Opin Rheumatol. 15:246-52.*

Dou Y, Luo J, Wu X, Wei Z, Tong B, Yu J, Wang T, Zhang X, Yang Y, Yuan X, ZhaoP, Xia Y, Hu H, Dai Y (2018). Curcumin attenuates collagen-induced inflammatory response through the "gutbrain axis". *J. Neuroinflammation*. 15:6.

Droge W (2002). Review Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82(1):47–95.

**E**arp JC, DuBois DC, Molano DS (2008). Modeling corticosteroid effects in a rat model of rheumatoid arthritis I: Mechanistic disease progression model for the time course of collagen-induced arthritis in Lewis rats. *J Pharmacol Exp Therap*. 326:532–545.

Eigner D, Scholz D (1999). *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. *J Ethnopharmacol.* 67: 1–6.

Ellman G.L (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch BiochemBiophys.* 82: 70-77.

Enroth C, Eger BT, Okamoto K, Nishino T, Pai EF (2000). Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97(20):10723-10728.

Eshed I, Feist E, Althoff C.E, Hamm B, Konen E, Burmester G.R, Backhaus M, Hermann K.G (2009). Tenosynovitis of the flexor tendons of the hand detected by MRI: an early indicator of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 48:887-91.

**F**arkhondeh T, Samarghandian S, Samini F (2016). Antidotal effects of curcumin against neurotoxic agents: an updated review. *Asian Pac. J. Trop. Med*. 9 (10): 947–953.

Favier A (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 108-115.

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996). Rheumatoid arthritis. *Cell.* 85 (3):307–10.

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

Firestein GS, Zvaifler NJ (1990). How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?. *Arthritis Rheum*. 33: 768–773.

Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R, Alvaro-Garcia JM (1990). Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol*.144:3347–3353.

Floyd R.A, Schneider J.E (1990). Hydroxy free radical damage to DNA. In *Membrane Lipid Oxidation,* vol 1 (Vigo-Pelfrey, C., ed) C. R. C. Press, Boca Raton, Florida.

**G**arcia YJ, Rodríguez-Malaver AJ, Peñaloza N (2005). Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *J Neurosci Methods*. 144(1):127–35.

Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z. Jore D (2003). Espèces réactives de l'oxygène: Comment l'oxygène peut-il devenir toxique?. *l'actualité chimique*. 91-96.

Genovese MC, Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, et al (2002). Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: two-year radiographic and clinical outcomes. *Arthritis Rheum*. 46:1443–1450.

Ghafourifar P, Cadenas E (2005). Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci*. 26 (4): 190–195.

Goëb V (2011). La polyarthrite rhumatoïde : comment l'expliquer ? Maladie auto-immune ou maladie hyper-inflammatoire ?. *La Lettre du Rhumatologue*. 373 :10-11.

Goel A, Kunnumakkara A.B, Aggarwal B.B (2008). Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 75:787-09.

Gomez-Reino J.J, Carmona L, Valverde V.R, Mola E.M, Montero M.D (2003). Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum.* 48: 2122-2127

Gornall A, Charles G, Bardawill J, Maxima M D (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. 177: 751–766.

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 30:1205–1213.

Griffe L. Poupot M, Marchand P, Maraval A, Turrin CO, Rolland O, Métivier P, Bacquet G, Fournié JJ, Caminade AM, Poupot R, Majoral JP (2007). Multiplication of human natural killer cells by nanosized phosphonate-capped dendrimers. *Angew Chem Int Ed Engl.* 46: 2523-2526.

Groussard C (2006). Oxidative stress and anaerobic exercise. *Science & Sports*. 21:62–67.

Grykiewicz G, Silfirski P (2012). Curucmin and curcuminoids in quest for medicinal status. *Acta Biochim. Pol. 59* : 201–212.

Gupta S, Prasad S, Ji H.K, Patchva S, Webb L.J, Priyadarsini K.I, Aggarwal B.B (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat. Prod. Rep.* 28: 1937–1955.

**H**ak AE, Choi HK (2008). Lifestyle and gout. *Curr Opin Rheumatol*. 20:179–186.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press.

Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals in biology and medicine (2007). In: *Free radicals in biology and medicine* 4th ed. New York: Oxford University Press.

Hanachi N, Charef N, Baghiani A, Khennouf S, Derradji Y, Boumerfeg S, Daoud H, Arrar L (2009). comparison of xanthine oxidase levels in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other joint inflammations. *Saudi Med J*. 30 (11): 1422-1425.

Harris ED (1990). Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Eng J Med*. 322(18): 1277-89.

Harrison R (2002). Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?.*Free Radical Biology & Medicine*. 33: 774-797.

Hart FD, Boardman PL (1963). Indomethacin: A new non-steroid anti-inflammatory agent. *Br Med J*. 2(5363):965-970.

Hashimoto S, Takahashi K, Amiel D, Coutts R.D, Lotz M (1998). Chondrocyte apoptosis and nitric oxide production during experimentally induced osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 41:1266-74.

Haute Autorité de Santé (2007), Polyarthrite rhumatoïde : Diagnostic et prise en charge initiale.

Hayder M (2011). Utilisation d'un Dendrimère Phosphoré comme une Nouvelle Approche Thérapeutique de la Polyarthrite Rhumatoïde. Thèse de Doctorat.Université de oulouse, Toulouse, France.

Henrotin Y, Kurz B, Aigner T (2005). Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?. *OsteoArthritis and Cartilage*.13: 643-654.

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

Hitchon CA, El-Gabalawy HS (2004). Oxidation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther*. 6: 265–278.

Hitchon C.A, Chandad F, Ferucci E.D, Willemze A, Ioan-Facsinay A, van der Woude D, Markland J, Robinson D, Elias B, Newkirk M, Toes R.M, Huizinga T.W.J, El-Gabalawy H.S (2010). Antibodies to porphyromonas gingivalis are associated with anticitrullinated protein antibodies in patients with rheumatoid arthritis and their relatives. *J Rheumatol.* 37:1105-1112.

Hochestein P, Atallah A. S (1988). The nature of oxidant and antioxidant systems in the inhibition of mutation and cancer. *Mutat. Res.* 202: 363–75.

Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*. 25:255–259.

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

Hoffman H, Schmut O (1980). The inability of superoxide dismutase to inhibit the depolymerization of hyaluronic acid by ferrous ions and ascorbate. Graefes Archiv Klin Ophtalmol. 214:181-185.

Huang G, Xu Z, Huang Y, Duan X, Gong W, Zhang Y, Fan J, He F (2013). Curcumin Protects Against Collagen-Induced Arthritis via Suppression of BAFF Production. *J Clin Immunol.* 33:550–557.

Huet O, Duranteau J (2008). Endothelial dysfunction: Involvement of reactive oxygen species. *Réanimation* .17: 387-392.

Hung W, Chen F, Lee C, Sun Y, Lee M, Huang H.W (2008). Membrane-Thinning Effect of Curcumin. *Biophys. J. 94* (11): 4331–4338.

Hyaden MR, Tyagi SC (2003). Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atherosclerop athy) with hyperglycaemia a late manifestation? The role of NOS, NO and redox stress. *Cardiovasc Diabetol.* 2:2–9.

**I**mai K, Nakanishi I, Ohkubo K, Ohno A, Mizuno M, Fukuzumi S, Matsumoto K-I, Fukuhara K (2019). Synthesis and radical-scavenging activity of C-methylated fisetin analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 27(8) 1720-1727.

Indo HP, Yen H-C, Nakanishi I, Matsumoto K, Tamura M, Nagano Y, et al (2015). A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr*. 56(1):1–7.

Ishikawa NK, Kasuya MCM, Vanetti MCD (2001). Antibacterial activity of Lentinula edodes grown in liquid medium. *Brazilian J. Microbiol*. 32: 206-210.

Itokawa H, Shi Q, Akiyama T, Morris-Natschke S.L, Lee K.H (2008) . Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chin. Med*. 3: 11.

**J**acobs J.W(1992). Opinions of patients with reumatoid arthritis about their own functional capacityJiang Y, Genant HK, Watt I, Cobby M, Bresnihan B, Aitchison R, et al (2000). A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum*. 43:1001–1009.

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

Jayarakasha G.K, Jagan Mohan RAO L., Sakariah K.K (2005). Chemistry and biological activities of C. longa. *Trends Food Sci. Tech*. 16(12): 533 – 548.

Jikimoto T, Nishikubo Y, Koshiba M et al (2001). Thioredoxin as biomarker for oxidative stress in patients with rheumatoid arthrisis. *Mol Immunol*. 38: 765-72.

Jobin C, Bradham C.A, Russo M.P (1999). Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol*. 163:3474- 83.

Jourdan J-P (2015). Curcuma et curcumine:de l'histoire aux intérêts thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université de Caen, Caen, France.

Jovanovic SV, Steenken S, Boone CW, Simic MG (1999). H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J Am Chem Soc.* 121: 9677–9681.

Juillard-Condat B, Constantin A, Cambon-Thomsen A, et al (2007). Cost of rheumatoid arthritis in France: comparison leflunomide/etanercept. *Therap.* 62:137 42.

**K**ageyama Y, Miyamoto S, Ozeki T, Hiyohsi M, Suzuki M, Nagano A (2000). Levels of rheumatoid factor isotypes, metalloproteinase- 3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in synovial fluid from various arthritides. *Clin Rheumatol*. 19(1): 14-20.

Kaipiainen-Seppanen O, Aho K, Isomaki H, Laakso M (1996). Shift in the incidence of rheumatoid arthritis toward elderly patients in Finland during 1975-1990. *Clin Exp Rheumatol.* 14:537-42.

Kalpana C, Menon V.P (2004). Modulatory effects of curcumin on lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced. *pol.j pharmacol*. 56: 581-586.

Kandikattu K, Bharath Rathna Kumar P, Venu Priya R, Sunil Kumar K, Ranjith Singh.B (2013). Evaluation of Anti-inflammatory Activity of *canthium parviflorum* by in vitro method. *Indian J. Biotech. Pharm. Res.* 1(5) : 729-730.

Kanter M (1998). Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proc Nutr Soc*. 57: 9-13.

Kaur H, Edmonds S.E, Blake D.R, Halliwell B (1996). Hydroxyl radical generation by rheumatoid blood and knee joint synovial fluid. *Ann Rheum Dis.* 55:915-20.

Keaney et al (1994). Free radicals, oxidative stress and antioxydants: Pathological and physiological significance. *Life sciences*. 296: 100-106.

Khopde S.M, priyadarsini K.I, Venkatesan P (1999). Free radical scavenging ability and antioxidant efficiency of curcumin and its substituted analogue. *Biophys. Chem*. 80: 85-91.

Khurana A, Ho C. T (1988). High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Curcuminoids and Their Photo-Oxidative Decomposition Compounds in Curcuma Longa L. *J. Liq. Chromatogr*. *11* (11): 2295–2304.

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.

Kirwan J, Bijlsma J W J, Boers M, Shea B J (2007). Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Sys Rev*.1:CD006356.

Kitabatake N, Tani Y , Doi E (1989). Rheological properties of heat-induced ovalbumin gels prepared by two-step and one-step heating methods. *J. Food Sci*.54: 1632-1638.

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

Klatt P, Lamas S (2000). Regulation of protein function by *S*glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem*. 267: 4928–4944.

Kleinveld HA, Hack CE, Swaak AJG et al (1988). Covalent crosslinks in oxygen free radical altered human immunoglobulin G. *Scand J Rheumatol*. Suppl 75: 157-63.

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

Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A (2014). Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha)*. 60(4):153–67.

Koechlin-Ramonatxo C (2006). Oxygen, oxidative stress and anti oxidant supplementation, or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et metabolism*. 20 :165–177.

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

Korytowski W, Kalyanaraman B, Menon IA Sarna T, Sealy RC (1986). Reaction of O2°-With melanins: electron spin resonance and spin trapping studies. *Biochim Biophys acta*, 882: 145-153.

Kouakou-Siransy G, Sahpaz S, Irié-Nguessan G, Datte Y.J, Kablan J, Gressier B, Bailleul F (2010). Oxygen species scavenger activities and phenolic contents of four West African plants. *Food Chem.* 118: 430–435.

Kroger H, Miesel R, Dietrich A, Ohde M, Altrichter S, Braun C, Ockenfels H (1997). Suppression of type II collagen-induced arthritis by N-acetyl-L-cysteine in mice. *Gen Pharmacol.* 29:671-4.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N (2004). Robbins & Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia: Saunders.

**L**ampe V, Milobedzka J (1913). Curcumin. *Ber Dtsch Chem Ges*. 46: 2235-40.

Langsjoen PH, Langsjoen AM (2003). The clinical use of depletion of coenzyme Q10 - A review of animal and human publications. *Biofactors*. 18: 101-111.

Lee DM, Weinblatt ME (2001). Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 358 (9285) : 903-11.

Lee, D.M, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB (2001). Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science.* 297:1689-1692.

Leelaprakash G, Mohan Dass S (2011). In-vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of Enicistemma axillar. *Int. J. Drug Dev. & Res*. 3(3): 189-196.

Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (2000). Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 99:15–24.

Li L, Braiteh FS, Kurzrock R (2005). Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Cancer*. 104:1322–31.

Liacini A, Sylvester J, Li W.Q, Zafarullah M (2002). Inhibition of interlenkin – 1 stimulated -1 (AP-1) and nuclear factor kappa B (NF-KB) transcription factors doewn-regulates matrix metalloproteinase gene expression in articular chondrocytes. *Matrix Biology.* 21: 251-262.

Lin JK, Pan MH, Shiau SYL (2000). Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. *Biofactors*. 13:153–158.

Lin WQ, Xie JX, Wu XM, Yang L, Wang HD (2014). Inhibition of Xanthine Oxidase Activity by Gnaphalium affine Extract. *Chin. Med. Sci. J*. 29(4): 225-30.Lu JM, Yao Q, Chen C (2013). 3,4-Dihydroxy-5-nitrobenzaldehyde (DHNB) is a potent inhibitor of xanthine oxidase: A potential therapeutic agent for treatment of hyperuricemia and gout. *Biochem. Pharmacol*. 86(9):1328-1337.

Liptay S, Bachem M, Häcker G, Adler G, Debatin KM, Schmid RM (1999). Inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis in Tlymphocytes by sulfasalazine. *Br J Pharmacol*. 128, 1361-1369.

Liu Y. Yang Z, Du J, Yao X, Lei R (2008). Interaction of Curcumin with Intravenous Immunoglobulin: A Fluorescence Quenching and Fourier Transformation Infrared Spectroscopy Study. *Immunobiology*. *213*, 651–661.

Lucas S (2016). The Pharmacology of Indomethacin. *Headache*. 56(2):436-446.

Luo W, Zhao M, Yang B, Ren J, Shen G, Rao J (2011). Antioxidant and antiproliferative capacities of phenolics purified from Phyllanthusemblica L. fruit. *Food Chemestry*. 26 : 277-282.

Lushchak VI (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 224C:164–75.

**M**aillefert J.F, Combe B, Goupille P, Cantagrel A, Dougados M (2003). Long term structural effects of combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: five year follow up of a prospective double blind controlled study. *Ann Rheum Dis.* 62:764-6.

Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK (2007). Curcumin-phospholipid complex: preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm*. 330:155–63. Markesbery WR, Carney JM (1999). Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 9:133-146.

Marczylo TH, Verschoyle RD, Cooke DN, Morazzoni P, Steward WP, Gescher AJ (2007). Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 60: 171–7.

Marklund S, Marklund G (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 47(3):469-474.

Marklund S.L (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:7634-7638.

Matzinger P (2002). An innate sense of danger. *Ann N Y Acad Sci.* 961:341-2;

Meister A (1994). Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res*. 54:1969–1975.

Menkès C-J, Allanore Y, Giraudet-Le Quintrec J.-S, Hilliquin P, Judet H, Kahan A, Puéchal X, Tubiana R (2004). La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte. MASSON, Paris.

Merry P, Grootveld M, Lunec J, Blake D.R (1991). Oxidative damage to lipids within the inflamed human joint provides evidence of radical-mediated hypoxic-reperfusion injury. *Am J Clin Nutr.* 53:362S-369S.

Metz S, Thiel W (2009). A combined QM/MM study on the reductive half-reaction of xanthine oxidase: substrate orientation and mechanism. *J. Am. Chem. Soc*. 131(41):14885-14902.

Miesel R, Zuber M (1993). Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation*. 17: 551–561.

Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem*. 86 (1): 271–278.

Miller L, Murray WJ (1998). Herbal Medicinals. A Clinician's Guide. Binghamton, NY: Pharmaceutical Products Press.

Milobedzka J, Kostanecki S, Lampe V (1910). Curcumin. *Ber Dtsch Chem Ges*. 43: 2163-70.

Miossec P (2003). Interleukin-17 in rheumatoid arthritis if T cells contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum*. 48:594–601.

Mira J.-P (2008). L'albumine endogène : un pouvoir anti-oxydant majeur. *Réanimation*. 3 :7-9.

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.

Momeni H.R, Eskandari N (2016). Effect of curcumin on kidney histopathological changes, lipid peroxidation and total antioxidant capacity of serum in sodium arsenite-treated mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2:93-97.

Monboisse JC, Braquet P, Randoux A, Borel JP (1983). Non-enzymatic degradation of acid soluble calf skin collagen by superoxide ion: protective efect of flavonoids. *Biochem Pharmacol*. 32:53-8.

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

Morel J, Miossec P, Combe B (2004). Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *EMC-Rhumatologie Orthopédie*. 1: 218–230

Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A (2008). The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. *J Clin Invest*. 118:868–878.

Motaghinejad M, Karimian M, Motaghinejad O, Shabab B, Yazdani I, Fatima S (2014). Protective effects of various dosage of Curcumin against morphine 4 induced apoptosis and oxidative stress in rat isolated hippocampus. *Curr. Pharmacol. Rep*. 2: 330–335.

Mulherin D.M, Thurnham D.I, Situnayake R.D (1996). Glutathione reductase activity, riboflavin status, and disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 55:837-40.

Myint P, Deeble DJ, Beaumont PC et al (1987). The reactivity of various free radicals with hyaluronic acid: Steady state and pulse radiolysis studies. *Biochim Biophys Acta*. 925:194-202.

**N**aik SR, Thakare SN, Patil SR (2011). Protective effect of curcumin on experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: Evidence of its antioxidant property. *Exp Toxicol Pathol*. 63: 419–431.

Nandy S, Shekhar H P, Ranjan BN, Chakraborty B (2012). *In vitro* evaluation of antioxidant activity of *Leucas plukenetii* (Roth) Spreng. *Asian J. Plant Sci.* 2 (3): 254-262.

Nci D (1996). Clinical development plan: curcumin. *J Cell Biochem* suppl. 26: 72–78.

Nepom GT, Nepom B (2002). Genetics of the Major Histocombatibility Complex in Rheumatoid Arthritis. In: Dieppe PA, Klippel JH, editors. Rheumatology. Mosby.

Neuzil J, Stocker R (1993). Bilirubin attenuate radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett*. 331: 103-104.

Nile S.H, Kumar B, Park S.W (2013). In vitro evaluation of selected benzimidazole derivatives as an antioxidant and xanthine oxidase inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des*. 82 (3): 290–95.

Nile S.H, Park S.W (2014). Antioxidant: α-glucosidase and xanthine oxidaseinhibitory activity of bioactive compounds from maize (Zea mays L.). *Chem.Biol. Drug Des*. 83: 119–125.

Noorafshan A, Ashkani-Esfahani S (2013). A Review of Therapeutic Effects of Curcumin. *Curr. Pharm. Des. 19*, 2032-2046.

**O**khawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *AnalyticalBiochemistry*. 95(2) : 351-358.

Oliveira I, Sousa A, Ferreira I. C.F.R, Bento A, Estevinho L, Pereira J. A (2008). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (Juglans regia L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology.* 46: 2326–2331

Olsson LM, Nerstedt A, Lindqvist AK et al (2012). Copy number variation of the gene NCF1 is associated with rheumatoid arthritis. *Antioxid Redox Signal*. 16:71-8.

O'Mahony J.A, Fox P.F, Kelly A.L (2013). Indigenous enzymes of milk advanced dairy chemistry: Volume 1A: Proteins: Basic Aspects. *4th Edition, Springer Science Business Media New York*. pp: 337-385.

Ong S.Q, Lee B.B, Tan G.P, Maniam S (2017). Capacity of black soldier fly and house fly larvae in treating the wasted rice in Malaysia. *Malaysian J. Sustain. Agricult*. 1(1): 08–10.

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

Oskoueian E, Abdullah N, Hendra R, Karimi E (2011). Bioactive compounds, antioxidant, xanthine oxidase inhibitory, Tyrosinase inhibitory and anti-Inflammatory activities of selected agro-industrial by-products. *Int. J. Mol. Sci.* 12(12): 8610-8625.

Oyaizu, M (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*. 44: 307–315.

Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, Basxkan K.S, Erçaga E, Celika S. E, Baki S, Yıldız L, Karamanc S, Apak R (2011). A comprehensive review of CUPRAC methodology. Critical Review. *Anal. Methods*. 3: 2439-2453.

**P**acher P, Nivorozhkin A, Szabo C (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol. Rev.* 58: 87–114.

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

Paleolog EM (2002). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 4(Suppl 3): S81-90.

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

Park JY, Pillinger MH (2007). Interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bull* NYU *Hosp Jt Dis.* 65(1): 4-10.

Pauff JM, Hille R (2009). Inhibition studies of bovine xanthine oxidase by luteolin, silibinin, quercetin and curcumin. *J. Nat. Prod*. 72(4):725-31.

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

Phaniendra A, Jestadi D.B, Periyasamy L (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem.* 30(1):11–26.

Pincemail J, Defraigne JO, Limet R, (2000). Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prevention. Ann Biol Clin. 58 (2):177-185.

Pryor W.A (2000). Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, Free Rad. *Biol. Med*. 28:141–164.

Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F (2011). Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmun Rev*.11:123-31.

Priyadarsini I, Maity D.K, Naik G. H, , Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG, Mohan H. (2003). Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic. Biol. Med.* 35(5): 475–84.

Priyadarsini K.I (2009). Photophysics, Photochemistry and Photobiology of Curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *J. Photochem. Photobiol. 10*: 81–96.

Priyadarsini K.I (2013). Chemical and structural features influencing the biological activity of curcumin. *Curr. Pharm. Des. 19*: 2093–2100.

Priyadarsini K.I (2014). The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Molecules*. *19*:20091-20112.

Pulla Reddy A, Lokesh BR (1994). Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. *Food Chem Toxicol.* 32: 279–283.

**R**adideau E, Bah S, Dupont C, Hilliquin P (2010). Polyarthrite rhumatoïde (1ère partie) : nouvelles biothérapies ciblant les cellules du système immunitaire, Rituximab et Abatacept. Dossier du CNHIM (centre national hospitalier d'information sur le medicament). XXXI, 4.

Ranjan D, Chen C, Johnston TD, Jeon H, Nagabushan M (2004). Curcumin inhibits mitogen stimulated lymphocyte proliferation, NFkappaB activation and IL-2 signaling. *J Surg Res*. 121:171–7.

Ravindranath V, Chandrasekhara N (1980). Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. *Toxicol*. 16: 259–265.

Ray G, Husain SA (2002). Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol.* 42: 1213–1232.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999).Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorizationassay. *Free Radical Bio. Med*. 26: 1231–1237.

Ringman J. M, Frautschy S. A, Teng E, Begum A. N. et al (2012). Oral curcumin for Alzheimer's disease: tolerability and efficacy in a 24-week randomized, double blind, placebo-controlled study. *Alzheimers Res. Ther*. 4:43.

Ritchie D.M, Boyle J.A, McInnes J.M, Jasani M.K, Dalakos T.G, Grieveson P, Buchanan W.W (1968). Clinical studies with an articular index for the assessment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis. *Q J Med.* 37:393-406.

Rochette L (2008). Stress oxydant et sepsis. *Reanimation*. 3: 1-4.

Rosen H, Michel BR, Vandevanter DR, JP Hughes (1998). Differential effects of myeloperoxidase-derived oxidants on Escherichia coli DNA replication. *Infect Immun.* 66(6): 2655–2659.

Rosenstein E.D, Greenwald R.A, Kushner L.J, Weissmann G (2004). Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation*. 28: 311-318.

Roth G, Chandra A, Nair M (1998). Novel bioactivities of *Curcuma longa* constituents. *J Nat Prod*. 61:542–545.

Ruby J, Kuttan G , Babu KD, Rajashekharan KN, Kuttan R (1995). Antitumor and oxidant activity of natural curcumnoids. *Cancer Lett*. 94:79–83.

Russo-Marie F (1996). La réaction inflammatoire dans la polyarthrite rhumatoïde. *Méd Thér*. 2:261–266.

**S**ale JE, Gignac M, Hawker G (2008). The relationship between diseasesymptoms, life events, coping and treatment, and depression among older adults with osteoarthritis. *J Rheumatol*. 35:335–42.

Samarghandiana S, Azimi-Nezhadb M, Farkhondehc T, Saminid F (2017). Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney. *Biomed Pharmacother*. 87: 223–229.

Sangeetha M, Kousalya K, Lavanya R, Cherukuru S, Chamundeeswari D, Uma Maheswara R (2011). *In-vitro* Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of Leaves of *CleodendronInerme. RJPBCS.* 2(1): 822-827.

Sany J (2003). Polyarthrite rhumatoide de l'adulte : conception actuelle. *Ed :John Libbey Eurotext, Montrouge*. pp : 6-298.

Saxne T, Palladino Jr MA, Heinegard D, Talal N, Wollheim FA (1988). Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum*. 31:1041–1045.

Scheibner K.A, Lutz M.A, Boodoo S, Fenton M.J, Powell J.D, Horton M.R (2006). Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol.* 177:1272-81.

Schellekens G.A, Visser H, de Jong B.A, van den Hoogen F.H, Hazes J.M, Breedveld F.C, and van Venrooij W.J (2000). The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 43:155-63.

Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q, Steiner G (2000). Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signalregulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 43:2501–2512.

Seemayer CA, Neidhart M, Jungel A, Gay RE, Gay S (2005). Synovial fibroblasts in joint de-struction of rheumatoid arthritis. *Drug Dis-cov Today: Disease Mechanisms*. 2: 359–365.

Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy Y.S.R., De B (2010). Free radicals, antioxydants, diseases and phytomedicines. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 3: 91-1001.

Shankar T, Shantha NV, Ramesh HP, Murthy IA, Murthy VS (1980). Toxicity studies on turmeric (Curcuma longa): Acute toxicity studies in rats, guinea pigs and monkeys. *Indian J Exp Biol*. 18(1): 73-5.

Sharma R.A, Gescher A.J, Steward W.P (2005). Curcumin: The story so far. *Eur. J. Cancer.* 41: 1955-1968.

Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ (2007). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 595:453–70.

Shi H, Noguchi N, Niki E (2001). Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods Enzymol*. 335: 157–66.

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

Shishodia S, Potdar P, Gairola C.G, Aggarwal B.B (2003). Curcumin [diferuloylmethane] down-regulates cigarette smoke-induced NF-kappaB activation through inhibition of IκBα in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1. *Carcinogenesis*. 24:1269-1279.

Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajenran R, Srinavas P.S (1998). Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta med.* 64(4): 353 – 356

Siems WG, Grune T, Esterbauer H (1995). 4-hydroxynonenal formation during ischemia and reperfusion of rat small-intestine. *Life Science*. 57:785–789.

Simic MG, Jovanovic SV (1989). Antioxidation mechanisms of uric acid. *J Am chem Soc*. 111: 5778-5782.

Siwak D.R, Shishodia S, Aggarwal B.B, Kurzrock R (2005). Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of IkappaB kinase and nuclear factor kappaB activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. *Cancer*, 104: 879-890.

Slimani S, Ladjouze-Rezig A (2014). Prevalence of rheumatoid arthritis in an urban population of Algeria: a prospective study. *Rheumatology* (Oxford). 53(3):571-573.

Smeets TJ, Kraan MC, van Loon ME, Tak PP (2003). Tumor necrosis factor alpha blockade reduces the synovial cell infiltrate early after initiation of treatment, but apparently not by induction of apoptosis in synovial tissue. *Arthritis Rheum*. 48:2155–2162.

Smirnoff N, Cumbes QJ (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry.* 28:1057–1060.

Sokka T (2008). Radiographic scoring in rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 66: 166-168.

Somnath P (2016). Trends in Selected Autoimmune Diseases. *US Pharm*. 41(6):11.

Soni K, Kuttan R (1992). Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. *Indian J Physiol Pharmacol*. 36(4): 273-275.

Sultatos L.G (1988). Effects of acute ethanol administration on the hepatic xanthine dehydrogenase/ xanthine oxidase system in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 246: 946–949.

Surh Y.J, Chun K.S, Cha H.H (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- kappa B activation. *Mutat Res*. 480- 481:243- 68.

Svendsen AJ, Junker P, Houen G , Kyvik KO, Nielsen C, Skytthe A, Holst R *(*2017). Incidence of chronic persistent rheumatoid arthritis and the impact of smoking: a historical twin cohort study. *Arthritis Arthritis Care* & *Research.* **69:** 616-24.

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

Swaak AJG, Kleiveld HA, Koster JF et al (1989). The possible role of free radical altered IgG in the aetiopathologenesis of rheumatoid arthrisis. *Rheumatol Int*. 9:1-6.

Szydlowska-Czerniaka A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*. 76:899-905.

**T**ak P.P (2000). Examination of the synovium and synovial fluid. In: FIRESTEIN G.S., PANAYI G.S., WOLLHEIM F.A. (eds), *Rheumatoid arthritis. Frontiers in pathogenesis andtreatment*, 1st edition, Oxford University Press, New York, 55-68.

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

Ter-Minassian A (2006). Cerebral metabolism and brain injury. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 25 :714–721

Tessier F, Marconnet P (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Sci Sports*. 10: 1-13.

Thannickal VJ, Fanburg BL (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 279 : L1005-28.

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

Tong B, Yuan X, Dou Y, Wu X, Wang Y, Xia Y, Dai Y (2016). Sinomenine induces the generation of intestinal Treg cells and attenuates arthritis via activation of aryl hydrocarbon receptor. *Lab Investig*. 96:1076–1086.

Tonnesen HH, Masson M, Loftsson T (2002). Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm*. 244:127-135.

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

Tütem E, Apak R, Baykut F (1991). Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper(II). *Analyst*.116:89-94.

Tuppo EE, FORMAN LJ (2001). Free radical oxidative damage and Alzheimer's disease. *JAOA*. 101: 11-15.

**U**mamaheswari M, Asokkumar K, Sivashanmugam A.T, Remyaraju A, Subhadradevi V, Ravi T.K (2009). *In vitro* xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb. *J. Ethnopharmacol. 124*: 646–648.

Uzma S, Bashir A, Mobasher A, Khalid H, Nadeem I-B (2014). Investigation of in vivo antioxidant activity of Euphorbia helioscopia latex and leaves methanol extract: a target against oxidative stress induced toxicity. *Asian Pac J Trop Med*; 7(Suppl 1): S369-S375.

**V**alko M, Rhodes C.J, Moncol J, Izakovic M, Mazura M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol* Interact. 160:1–40.

van Vollenhoven R.F (2009). Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat RevRheumatol.* 5: 531-541.

VanderBorght A, Geusens P, Raus J, Stinis-sen P (2001). The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: Role of autoreactive T cells and new immunotherapies. *Sem Arthritis Rheum*. 31:160–75.

Vane J. R, Botting R.M (1995). New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*. 44(1): 1-10.

Vareed S. K, Kakarala M, Ruffin M. T, Crowell J. A. Normolle DP, Djuric Z, Brenner DE. (2008), Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidem Biomar Prev.* 17:1411–1417.

Veale D.J (1999). The role of arthroscopy in early arthritis [editorial]. *Clin Exp Rheumatol*. 17:37-38.

Villanueva A (1986). "Experimental Studies in Demineralization and Its Effects on Cytology and Staining of Bone Marrow Cells". *J Histotechnol 9*. 3: 155-161.

Vincent F, Brun H, Clain E, Ronot X, Adolphe M (1989). Effects of oxygen-free radicals on proliferation kinetics of cultured rabbit articular chondrocytes. *J Cell Physiol.* 141:262-6.

**W**ahlstrom B and Blennow G (1978). A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol* (Copenh). 43: 86–92.

Walker RB, Everette JD (2009). Comparative Reaction Rates of Various Antioxidants with ABTS Radical Cation. *J. Agric. Food Chem*.57 (4): 1156–1161.

Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin L I, Ho Y S, Hsieh C Y, Lin J K (1997). Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal*. 15:1867–1876.

Wehr NB, Levine RL (2012). Quantitation of protein carbonylation by dot blot. *Anal Biochem*. 423(2):241–5.

Weyand C.M, Goronzy J.J, Takemura S, Kurtin P.J (2000). Cell–cell interactions in synovitis. Interactions between T cells and B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2: 457–463.

White LB, Foster S (2000). The Herbal Drugstore. Emmaus, PA: Rodale Inc.

Woo M.S, Jung S.H, Kim S.Y, Hyun J.W, Ko K.H, Kim W.K. Kim HS (2005). Curcumin suppresses phorbol esterinduced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting the PKC to MAPK signaling pathways in human astroglioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335: 1017-1025.

**Y**adav S, Shire S.J, Kalonia D.S (2011). Viscosity Analysis of High Concentration Bovine Serum Albumin Aqueous Solutions. *Pharm Res.* 28:1973–1983

Yan L.J (2014). Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerances. *Redox Biology*. 2: 165-169.

Yefrida H.S, Alif A, Efdi M, Aziz H (2018). Modification of Phenanthroline Method to determine Antioxidant Content in Tropical Fruits Methanolic Extract. *Res. J. Chem. Environ.* 22 (4): 28-35.

Yılmaz Savcun G, Özkan E, Dulundu E, Topaloğlu Ü, Özer Şehirli A, Tok O.E, Ercan F, Şener G (2013). Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin against hepatorenal oxidative injury in an experimental sepsis model in rats. *Ulus Travma Acil Cerr Derg*.19(6): 507-517.

Young-Joon S (1999). Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res*.428:305–327.

Yousef MI, Omar SA, El-Guendi MI, Abdelmegid LA (2010). Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. *Food Chem Toxicol*. 48(11):3246–61.

Youssef P.P, Smeets T.J.M, Brenihan B, Cunnane G, Fitzgerald O, Breedveld F, Tak P P *(*1998). Microscopic measurement of cellular infiltration in the rheumatoid arthritis synovial membrane: a comparison of semiquantitative and quantitative analysis. *Br J Rheumatol*. 37:1003-1007.

**Z**ahidah A.F, Faizah O, Nur Aqilah K, TATY ANNA K (2012). Curcumin as an Anti-Arthritic Agent in Collagen-InducedArthritic *Sprague-Dawley* Rats. *Sains Malaysiana.* 41(5): 591–595.

Zuo J, Xia Y, Li X, Chen JW (2014). Therapeutic effects of dichloromethane fraction of Securidacain appendiculata on adjuvantinduced arthritis in rat. *J Ethnopharmacol*.153: 352-358.

**الملـخص**

الهدف الرئيسي من هذا البحث هو تقييم تأثير الكركمين على الإجهاد التأكسدي والالتهاب في حالة الالتهاب المفصلي الروماتويدي المحرض بواسطة الكولاجين II عند الفئران .بداية تم تقييم التأثير المضاد للأكسدة في وسط خارج حيوي كمضاد أكسدة أولي (القدرة على التقاط الجذور الحرة و القدرة الارجاعية ) ، وكمضاد أكسدة ثانوي أو وقائي (القدرة على استخلاب الحديد) ، أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الاختبارات أن الكركمين له قدرة عالية على التقاط وارجاع الجذور الحرة ، كما ان له تاثير فعال في استخلاب المعادن الانتقالية. من ناحية أخرى ، أظهر تقدير النشاط المضاد للالتهابات ومثبط نشاط ال XO في وسط خارج حيوي أن الكركمين مضاد جيد للالتهاب بقيمة $IC_{50}$ مساوية ل 1181.69 ± 1.11 ميكروغرام / مل ومثبط ممتاز لانزيم XO مع بقيمة $IC_{50}$ مساوية ل 0.71 ± 0.06 ملغم / مل. تم تأكيد هذه النتائج عند الفئران في حالة الالتهاب المفصلي الروماتيدي المحرض بواسطة الكولاجين II ، و الذي تم خلاله تقييم التأثير الوقائي والعلاجي للكركمين (110 مغ / كغ) لمدة 40 يومًا ، حيث تم إثبات تأثير فعال ومهم من خلال انخفاض في العلامات السريرية المتعلقة بوزن الجسم ، وسمك باطن الارجل ، ودرجة التهاب المفاصل ، كذلك من خلال الحفاظ على الخصائص الدموية ، ومنع تخريب المفاصل المشخص بالتصويرالإشعاعي و الفحص المجهري للانسجة. من ناحية أخرى ، أظهر الكركمين تحسنًا في حالة علامات الإجهاد التأكسدي ( GSH، CAT، SOD، MDA) وحتى XO ، على مستوى الأنسجة.وأخيرًا ، تشيرهذه النتائج إلى أن الكركمين يمكن أن يصنف كمضاد أكسدة ومضاد التهاب طبيعي جد فعال.

**الكلمات المفاتيح**: كركمين, مضاد اكسدة, إنزيم مؤكسد للكزانثين، تخريب الالبومين, التهاب المفاصل الروماتيدي.

**RESUME**

Cette étude a pour but principal d'évaluer l'effet de la curcumine sur le stress oxydant et sur l'inflammation dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (PR) induite par le collagène-II chez les rats. Dans un premier temps l'effet antioxydant a été évalué *in vitro* en tant qu'un antioxydant primaire (effet scavenger des radicaux libres, et capacité réductrice), et en tant qu'un antioxydant secondaire ou préventif, (test de chélation de fer ferreux), les résultats obtenus par ces essais montrent que la curcumine possède une bonne activité scavenger des radicaux libres, et présente une activité chélatrice des métaux de transition efficace. D'autre part, l'estimation de l'activité anti-inflammatoire et l'activité inhibitrice vis-à-vis de la XO *in vitro*, montre que la curcumine est une bonne molécule anti-inflammatoire avec une valeur d'$IC_{50}$ de 1181,69 ± 1,11 µg / ml et excellent inhibiteur de la XO avec une $IC_{50}$ = 0,71 ± 0,06 mg / ml. Ces résultants ont été prouvés *in vivo*, dans le cas de la PR, induites chez des rats Wistars avec du collagène-II. Ces animaux ont été suivis pendant 40 jours. L'évaluation de l'effet préventif et curatif de la curcumine (110 mg/kg), a montré un effet efficace et considérable témoigné par une réduction des signes cliniques concernant : le poids corporel, l'épaisseur des pattes, le score arthritique, un maintien des paramètres hématologiques, et par une prévention des dommages articulaires estimés par le diagnostic radiologique et histopathologique. D'autre part, la curcumine a montré une amélioration de l'état des marqueurs du stress oxydatif (GSH, CAT, SOD, MDA) et même de la XO, au niveau tissulaire. Finalement, ces résultats indiquent que la curcumine peut être classer en tant qu'un bon anti-oxydant et anti-inflammatoire naturel indiqué pour soulager et prévenir les PR.

**Mots-clés**: Curcumine, anti-oxydant, XO, dénaturation d'albumine, polyarthrite rhumatoïde.

**SUMMARY**

The main aim of this research is to evaluate the effect of curcumin on oxidative stress and inflammation in the case of collagen-II induced rheumatoid athritis (RA) in rats. The antioxidant effect was initially assessed *in vitro* as a primary antioxidant (radical-scavenging and reducing abilities assays), and as a secondary or preventive antioxidant, (ferrous iron chelation assay), the results obtained from these assays showed that curcumin has a strong free radical scavenger activity and reducing abilities, and has an effective transition metal chelating activity. On the other hand, estimating of the anti-inflammatory activity and the inhibitory of XO activity *in vitro*, showed that curcumin is a good anti-inflammatory with an $IC_{50}$ value of 1181.69 ± 1.11 µg / ml and excellent XO inhibitor with an $IC_{50}$ = 0.71 ± 0.06 mg / ml. These findings were confermed *in vivo*, in the case of collagen-II induced RA in rats, accompanied by an assessment of the preventive and curative effect of curcumin (110 mg / kg) for 40 days, were demonstrated an effective and important effect evidenced by a reduction in clinical signs concerning: body weight, thickness of the legs, and arthritic score, by maintaining hematological parameters, and by preventing joint damage estimed by radiological or histopathological diagnosis. On the other hand, curcumin has showed an improvement in the state of the markers of oxidative stress (GSH, CAT, SOD, MDA) and even of XO, at the tissue level. Finally, these rasultats indicate that curcumin can calasse as a good natural antioxidant and anti-inflammatory.

**Key words**: Curcumin, anti-oxydant, XO, albumine denaturation, rhumatoid arthritis.