

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°/SNV/2021

THÈSE

Présentée par

ABDELOUHAB Katia

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : BIOCHIMIE

THÈME

**ACTIVITES ANTIINFLAMMATOIRES ET
ANTIARTHRITIQUES D'EXTRAITS DE HERTIA
CHERIFOLIA CHEZ LA SOURIS ET LE RAT AVEC
ARTHRITE RHUMATOIDE EXPERIMENTALE**

Soutenue publiquement le/...../2021

DEVANT LE JURY

Président	CHAREF Nouredine	Professeur	Univ. F A Sétif 1
Directeur	ARRAR Lekhmici	Professeur	Univ. F A Sétif 1
Examineurs	KHETTAL Bachra	Professeur	Univ. Bejaia
	BEDJOU Fatiha	Professeur	Univ. Bejaia
	DIAFAT Abdelouahab	MCA	Univ. Bordj Bouarréridj
	AICHOOR Ridha	MCA	Univ. F A Sétif 1
Invité	BAGHIANI Abderrahmane	Professeur	Univ. F A Sétif 1

Laboratoire de Biochimie Appliquée

DÉDICACE

À ma très chère maman.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à exprimer ma profonde gratitude à M. le Professeur **ARRAR Lekhmici**, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir proposé une thématique passionnante reliant les plantes médicinales et les pathologies inflammatoires. Je le remercie également pour ses conseils précieux, ses encouragements et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée. Merci pour sa patience et pour ses corrections et relectures averties. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon plus grand respect.

Je remercie vivement les membres du jury qui ont bien voulu rapporter ce travail :

Professeur **CHAREF Noureddine**, Université Ferhat Abbas Setif 1, qui me fait l'honneur de présider ce jury, et qui a eu l'amabilité d'examiner ce travail.

Professeurs **BEDJOU Fatiha** et **KHETTAL Bachra**, Université Abderrahmane Mira de Béjaïa, Dr. **AICHOUB Ridha**, Université Ferhat Abbas Sétif 1, et Dr. **DIAFAT Abdelouahab**, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi de Bordj Bouarréridj, qui me font l'honneur d'être membres de ce jury et qui ont eu l'amabilité de bien vouloir examiner ce travail.

Professeur **BAGHIANI Abderrahmane**, Université Ferhat Abbas Setif 1, mon invité d'honneur.

Je tiens à avoir ici une pieuse pensée à la mémoire du Professeur **LOUAILECHE Hayette**, qui m'avait ouvert les portes de son laboratoire à l'université de Béjaïa et pour son aide inestimable.

Mes remerciements vont également au Professeur **Ryszard AMAROWICZ**, Institut de recherche en reproduction animale et en aliments, Olsztyn, Pologne, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour la réalisation de l'analyse HPLC.

Merci également aux Professeurs **KATI Djamel Eddine**, **ZEBBOUDJ Aicha** et **ATMANI-KILANI Dina**, université de Béjaïa, pour leur aide.

Je remercie particulièrement les ingénieurs de laboratoire à l'université de Sétif, **Intissar Serrai** et à l'université de Béjaïa, **Lila Saadi Ahmed**, **Katia Adrar**, **Nadia Imadalou** et **Nassima** pour leur aide et assistance sans faille.

Mes remerciements les plus vifs aux techniciennes de la plateforme d'anatomopathologie de la faculté de médecine à l'université de Béjaïa, **HakimaYahi-Rabhi, Linda Mezhoud, Louiza Bougandoura** et **Fella Issaadi**, pour leur aide précieuse et pour le travail remarquable qu'elles font tous les jours.

Un grand merci à mes amis et collègues à l'université de Sétif et à l'université de Béjaïa, **Ahlam Inouri-Iskounen, Dalila Messaoudi, Amira Chahrazed Benabdelhak, Farah Yous, Meriem Hamoudi, Saliha Remila, Nouzha Mayouf, Hichem Meziti, Soumia Benbrinis, Kamel Mokhnache, Farida Belkhiri, Asma Mosbah, Soraya Madoui, Nassima Karnouf, Seoussen Kada, Hanane Khither**, et à mes étudiantes **Melissa Baloul** et **Rym Azzouz** pour leur aide et soutien.

Merci aussi à mes amies de l'USTHB, **Soumia Remana, Djamila Izemrane, Ibtissem Rahim** et **Houda Belguendouz** pour leurs soutien et encouragements.

Je tiens à remercier vivement **Pr. Rachid BELHATTAB** et **Sarra ROUMILI**, département de biochimie de la faculté SNV à l'université Sétif 1, et tous mes enseignants et mes collègues avec qui j'ai eu la chance et le plaisir de travailler pendant quatre belles années.

J'exprime mes remerciements les plus chaleureux et les plus sincères à tous les membres de notre équipe avec qui j'ai beaucoup appris :

A commencer par **Dr. Widad SOBHI** pour ses conseils et encouragements continus et pour tous ces moments de partage humain et intellectuel.

Mes collaborateurs du quotidien au laboratoire, chacun à sa manière, **Wafa Cheniti, Imène Roumili, Nacer Amraoui, Thoria Guemmez, Sana Aouachria** et **Abderrahim Benslama**, pour leur aide inestimable, leur générosité, leur esprit d'équipe et pour leurs qualités humaines et professionnelles incontestables.

Merci à toute personne qui m'a aidé même par un sourire.

Enfin, je dis mille mercis à **mes parents**, à mes sœurs **Soraya, Nassima, Souad** et à mon frère **Tarik** et sa femme **Nahla** ainsi qu'à mes nièces et neveux, **Hanane, Nassim, Mounia, Amir, Ahmed Rafik** et **Kenza** pour m'avoir encouragée le long de ces années et pour avoir vécu avec moi chaque instant de cette thèse.

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biochimie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif 1 ; le Laboratoire de Biochimie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abderrahmane Mira de Bejaia ; et le Laboratoire des Propriétés Physico-Chimiques des Aliments, Institut de Recherche en Reproduction Animale et en Aliments, Académie Polonaise des Sciences, Olsztyn, Pologne.

Et a fait l'objet d'une publication et une communication :

Publication

Abdelouhab K, Aouachria S, Guemmez T, Charef N, Baghiani A, Louaileche H, Amarowicz R, Arrar L. (2019). Comparative study of the polyphenol content related-antioxidant and anti-inflammatory activities of methanolic extracts from different parts of *Hertia cheirifolia*. International Journal of Pharmaceutical Research, 11(4), 209-215.

Communication

Abdelouhab K, Cheniti Wafa, Imane Naamoune, Arrar L. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanolic extracts from leaves and roots of *Hertia cheirifolia*. Algerian American Foundation Summer University, July 8th-14th. University of Sciences and Technology, Houari Boumediene (USTHB), Algiers.

ملخص

تعد نبتة كرشون *Hertia cheirifolia* L. من النباتات الطبية التي تنتمي الى عائلة Asteraceae وهي معروفة باستعمالها التقليدي في علاج اضطرابات الجهاز الهضمي والتثام الجروح . تم من خلال هذه الدراسة العمل على مستخلصات ميثانولية لمختلف أجزاء النبتة (الورقة، الساق، الزهرة والجزر)، حيث أظهرت نتائج تحليل محتوى المركبات الفينولية أن مستخلص الأوراق (ED-Fe) يحتوي على اعلى كمية (6.21 ± 50.61 مغ مكافئ حمض الغاليك / غ من المستخلص). تم الكشف عن سبع مركبات فينولية مختلفة بواسطة تقنية التحليل الكروماتوغرافي (HPLC-DAD) و التي أظهرت وجود أربعة أحماض فينولية مشتقة من حمض الكافيك وثلاث مركبات فلافونويدية بما في ذلك روتين واثان من مشتقاته. إضافة إلى ذلك، أظهر مستخلص الأوراق (ED-Fe) أعلى قدرة مضادة للأكسدة (0.58 ± 76.48 ميكروغرام / مل) ضد الجذر $ABTS^{++}$ و أقوى قدرة إرجاعية للحديد (0.003 ± 0.307 ميليمول/ غ من المستخلص). وقد أظهرت دراسة النشاط المضاد للالتهاب باستخدام النموذج التجريبي لوذمة الأذن ، المحرصة بزيت الكروتون عند الفأر، أن مستخلص ED-Fe كان له أقوى تأثير مضاد للالتهاب (6.08 ± 43.52 %). بنفس الطريقة، أظهر المستخلص ED-Fe فعاليته ضد الالتهاب في النموذج التجريبي لوذمة الساق ، المستحثة بمادة الكراجينين عند الجرذ، والتي قدرت بنسبة 1.55 ± 23.67 % . وأخيرا، أظهرت دراستنا للدور الوقائي لمستخلصات *Hertia cheirifolia* من التهاب المفاصل تأثيرا معتبرا، خاصة بالنسبة لمستخلص (ED-Fe) الذي خفض من التهاب الساق المزمن المحرض بمعامل فروند الكامل عند الجرذ، وذلك بنسبة 4.4 ± 26.14 % . و لقد كان هذا التأثير مصحوبا بتحسن ملحوظ في مختلف النتائج السريرية، المصلية والنسجية. يشير مجمل هذه النتائج إلى أن الفاعلية المضادة للأكسدة و للالتهاب التي تميز مستخلصات نبتة *Hertia cheirifolia* ، لديها علاقة وثيقة بمحتواها من عديدات الفينول وهي تعد بذلك مصدرا طبيعيا هاما لتطوير جزيئات دوائية جديدة.

الكلمات المفتاحية: *Hertia cheirifolia*، عديدات الفينول، النشاطية المضادة للأكسدة، النشاطية المضادة للالتهاب، التهاب المفاصل المحرض بمساعد فروند.

Résumé

Hertia cheirifolia L. est une plante médicinale de la famille des Asteraceae connue pour son usage traditionnel dans le traitement des troubles digestifs et la cicatrisation des plaies. La présente étude a porté sur des extraits méthanoliques des différentes parties de la plante (feuille, tige, fleur et racine). D'abord, l'analyse du contenu en composés phénoliques a montré que la teneur la plus élevée est contenue dans l'extrait de feuille (ED-Fe) (50.61 ± 6.21 mg EAG/g d'extrait). Sept différents composés phénoliques ont été identifiés par HPLC-DAD, dont quatre acides phénoliques dérivés de l'acide caféique et trois flavonoïdes dont la rutine et deux de ses dérivés. Par ailleurs, l'extrait ED-Fe a montré la capacité antioxydante la plus élevée envers le radical ABTS^{•+} (76.48 ± 0.58 µg/mL), et le meilleur pouvoir réducteur du fer (0.307 ± 0.003 mmol. Fe²⁺/g d'extrait). L'étude de l'activité anti-inflammatoire dans le modèle de l'œdème de l'oreille induit à l'huile de croton chez la souris a montré que l'extrait ED-Fe avait le meilleur effet ($43.52 \pm 6.08\%$). De même, le modèle de l'œdème de la patte induit à la carragénine chez le rat a été marqué par un effet significatif de l'extrait ED-Fe ($23.67 \pm 1.55\%$ à 200 mg/Kg). Enfin, un effet anti-inflammatoire préventif très intéressant a été obtenu, notamment avec l'extrait ED-Fe ($26.14 \pm 4.24\%$) dans le modèle de l'arthrite induite à l'adjuvant complet de Freund (AIA) chez le rat. Cet effet a été accompagné d'une nette amélioration des paramètres cliniques, sériques et histologiques. L'ensemble de ces résultats, suggèrent que le potentiel antioxydant et anti-inflammatoire des extraits de *Hertia cheirifolia* serait fortement lié à leur contenu en polyphénols. Ceci constitue une source naturelle prometteuse pour le développement de nouvelles molécules pharmacologiques.

Mots clés : *Hertia cheirifolia*, polyphénols, activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, arthrite induite à l'adjuvant de Freund.

Abstract

Hertia cheirifolia L. is a medicinal plant that belongs to the Asteraceae family. This plant is known for its traditional use in the treatment of digestive disorders and wound healing in the east of Algeria and in Tunisia. In the present study, methanolic extracts from the different parts of the plant; leaf, stem, flower and root were used. First, phenolic compounds content analysis revealed that the highest content was obtained with the delipidated leaf extract (DE-L) (50.61 ± 6.21 mg EAG/g extract). Seven different phenolic compounds were identified by HPLC-DAD analysis, four of them were derived from caffeic acid in addition to three flavonoids including rutin and its derivatives. Furthermore, DE-L showed the highest antioxidant capacity towards the ABTS^{•+} radical (76.48 ± 0.58 $\mu\text{g/mL}$), and iron reducing capacity (0.307 ± 0.003 mmol. Fe²⁺/g extract). The anti-inflammatory activity was studied using the croton oil-induced ear edema model in mice and showed that the DE-L had the strongest effect ($43.52 \pm 6.08\%$). Similarly, the carrageenan-induced paw edema model in rats was marked by a significant effect of DE-L ($23.67 \pm 1.55\%$ at 200 mg/Kg). Finally, a very interesting preventive anti-inflammatory effect was observed with DE-L ($26.14 \pm 4.24\%$) in the Freund's complete adjuvant induced arthritis (AIA) model in rats. This effect was associated with a considerable improvement in clinical, serological and histological parameters. These results suggest that the antioxidant and anti-inflammatory potential of *Hertia cheirifolia* extracts were strongly related to their polyphenols content. Our results support the use of this plant in traditional medicine and provide a promising natural source for the development of new pharmacological molecules.

Keywords: *Hertia cherifolia*, polyphenols, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, Freund's adjuvant-induced arthritis.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Médiateurs oxygénés et azotés du stress oxydant.....	15
Tableau 2. Antioxydants endogènes (enzymatiques et non enzymatiques).....	17
Tableau 3. Rendement de l'extraction et contenu en lipides des différentes parties de <i>H. cheirifolia</i>	71
Tableau 4. Contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits bruts et délipidés des différentes parties de <i>H. cheirifolia</i>	72
Tableau 5. Composition en acides phénoliques et en flavonoïdes des extraits méthanoliques de <i>Hertia cheirifolia</i> , analysés par HPLC-DAD.....	78
Tableau 6. Activité neutralisant le radical DPPH [*] exercée par les extraits méthanoliques bruts et délipidés et par la fraction lipidique des extraits de <i>Hertia cheirifolia</i>	84
Tableau 7. Gain de poids corporel chez les rats des différents groupes expérimentaux après induction de l'AIA.....	121
Tableau 8. Index de poids des organes (foie, rate et thymus) par rapport au poids corporel chez les rats des différents groupes expérimentaux après induction de l'AIA.....	123

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Principaux médiateurs inflammatoires cellulaires et humoraux.....	4
Figure 2. Voies de signalisation moléculaire pro-inflammatoire.....	10
Figure 3. Génération des espèces réactives oxygénées et azotées (ERO et ERA).....	14
Figure 4. Interaction potentielle entre le stress oxydant et l'inflammation.....	21
Figure 5. Etiologie multifactorielle et pathogénie de l'arthrite rhumatoïde.....	25
Figure 6. Développement et progression de l'arthrite rhumatoïde.....	26
Figure 7. Différentes classes des métabolites secondaires.....	37
Figure 8. Classification des terpènes selon le nombre d'unités isoprène.....	39
Figure 9. Structure des principaux noyaux chimiques des alcaloïdes.....	45
Figure 10. Principales classes des polyphénols.....	47
Figure 11. Classification chimique des flavonoïdes.....	48
Figure 12. Photographies de <i>Hertiacheirifolia</i> L.	52
Figure 13. Procédure d'extraction et de délipidation à partir des différentes parties de <i>Hertia cheirifolia</i> L.	57
Figure 14. Contenu en polyphénols totaux des extraits des feuilles, des tiges, des fleurs et des racines de <i>H. cheirifolia</i>	73
Figure 15. Contenu en flavonoïdes des extraits des feuilles, des tiges, des fleurs et des racines de <i>H. cheirifolia</i>	75
Figure 16. Profil phénolique des extraits méthanoliques délipidés de <i>Hertia cheirifolia</i> analysés par HPLC-DAD	77
Figure 17. Activité neutralisant le radical libre DPPH [•] en fonction de la concentration des extraits méthanoliques de <i>Hertia cheirifolia</i>	82
Figure 18. Activité neutralisant le radical libre ABTS ^{•+} en fonction de la concentration des extraits méthanoliques de <i>Hertia cheirifolia</i>	86
Figure 19. Capacité antioxydante (TEAC) des extraits méthanoliques de <i>Hertia cheirifolia</i> envers le radical libre ABTS ^{•+}	88
Figure 20. Concentrations inhibitrices (IC ₅₀) de l'oxydation du radical libre ABTS ^{•+} des différents extraits méthanoliques de <i>Hertia cheirifolia</i>	89
Figure 21. Potentiel antioxydant réducteur du fer (FRAP) des différents extraits méthanoliques de <i>Hertia cheirifolia</i>	92
Figure 22. Cinétique de l'inhibition du blanchissement de la β-carotène par les différents extraits méthanoliques de <i>Hertia cheirifolia</i>	95

Figure 23. Capacité inhibitrice du blanchissement de la β -carotène par les extraits méthanoliques de <i>Hertia cheirifolia</i>	97
Figure 24. Activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques de <i>Hertia cheirifolia</i> dans le modèle de l'œdème de l'oreille induit au PMA.....	99
Figure 25. Activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques de <i>Hertia cheirifolia</i> dans le modèle de l'œdème de l'oreille induit à l'huile de croton.....	102
Figure 26. Taux d'inhibition de l'œdème induit à l'huile de croton par les extraits méthanoliques délipidés de <i>Hertia cheirifolia</i>	104
Figure 27. Effet des extraits méthanoliques délipidés de <i>Hertia cheirifolia</i> sur la cinétique de l'évolution de l'épaisseur de l'œdème induit à la carragénine chez le rat.....	107
Figure 28. Epaisseur de l'œdème de la patte induit à la carragénine après traitement par les différents extraits méthanoliques délipidés de <i>Hertia cheirifolia</i>	108
Figure 29. Taux d'inhibition de l'œdème exercé par les différents extraits méthanoliques délipidés de <i>Hertia cheirifolia</i> dans le modèle de l'œdème de la patte induit à la carragénine chez le rat.....	110
Figure 30. Taux du gonflement de la patte chez les rats avec AIA après administration des extraits méthanoliques délipidés de <i>Hertia cheirifolia</i>	115
Figure 31. Effets préventif et curatif des extraits méthanoliques délipidés de <i>Hertia cheirifolia</i> chez les rats avec AIA.....	118
Figure 32. Concentration du MDA plasmatique après administration des extraits de <i>Hertia cheirifolia</i> en préventif et en curatif dans le modèle de l'AIA chez le rat.....	125
Figure 33. Activité de la MPO plasmatique après administration des extraits de <i>Hertia cheirifolia</i> en préventif et en curatif dans le modèle de l'AIA chez le rat.....	128
Figure 34. Concentration du NO plasmatique après administration des extraits de <i>Hertia cheirifolia</i> en préventif et en curatif dans le modèle de l'AIA chez le rat.....	131
Figure 35. Observation microscopique de la structure histologique de l'articulation de la patte chez le rat normal et le rat avec AIA	134
Figure 36. Observation microscopique de la structure histologique de l'articulation de la patte chez les rats traités en préventif au diclofénac et aux extraits de <i>Hertia cheirifolia</i>	136
Figure 37. Observation microscopique de la structure histologique de l'articulation de la patte chez les rats traités en curatif au diclofénac et aux extraits de <i>Hertia cheirifolia</i>	137

LISTE DES ABREVIATIONS

- ACF** : adjuvant complet de Freund.
- ACPA** : anti-citrullinated protein antibodies.
- AIA** : adjuvant-induced arthritis.
- AINS** : anti-inflammatoires non stéroïdiens.
- AIS** : anti-inflammatoires stéroïdiens.
- AR** : arthrite rhumatoïde.
- ARMM**: anti-rhumatismaux modificateurs de la maladie.
- bFGF**: basic fibroblast growth factor.
- C-II**: collagène de type-II.
- CAT** : catalase.
- COX** : cyclooxygénase.
- CPA** : cellule présentatrice de l'antigène.
- CTF** : contenu total en flavonoïdes.
- CTP** : contenu total en polyphénols.
- DAMPs** : danger associated molecular patterns.
- DMARDs**: disease-modifying antirheumatic drugs.
- ECM** : extracellular matrix.
- EPA** : eicosa-pentaenoïc acid.
- ERA** : espèces réactives azotées.
- ERO** : espèces réactives oxygénées.
- ES** : épitopes de susceptibilité.
- FRAP**: ferric reducing antioxidant power.
- GM-CSF**: granulocyte monocyte-colony stimulating factor.
- GPx** : glutathion peroxydase.
- H&E** : hématoxyline et éosine.

HLA : human leukocyte antigen.

HPLC-DAD : high-performance liquid chromatography with a diode-array detector.

ICAM : intercellular adhesion molecule.

IFNs : interférons.

iNOS: inducible nitric oxide synthase

JAK/STAT: Janus kinase/signal transducers and activators of transcription.

LFA-1: lymphocyte function-associated antigen 1.

LOX: lipoxygénase.

LT: leucotriènes.

LTh: lymphocytes T helper.

LT-reg : lymphocytes T régulateurs.

MAPK: mitogen activating protein kinase.

M-CSF: macrophage colony stimulating factor.

MCA : médecine complémentaire et alternative.

MDA : malondialdéhyde.

MMP- : matrix metalloprotease.

MPO : myéloperoxydase.

MPS : médiateurs pro-résolvants spécialisés.

MTX : methotrexate.

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NEDD: N-1-Naphtylethylènediamine dihydrochloride.

NFAT: nuclear factor of activated T cells.

NFκB: nuclear factor kappa B.

PADI: peptidyl arginine déiminase.

PAF: platelet-activating factor.

PAMPs: pathogen associated molecular patterns.

PDGF: platelet derived growth factor.

PG : prostaglandines.

PLA2 : Phospholipase A2.

PNN : polynucléaires neutrophiles.

PTPN22 : protéine Tyrosine Phosphatase Non récepteur type 22.

RANKL: receptor Activator of NFκB Ligand.

SFL: synoviocytes fibroblastes-like.

SOD: superoxide dismutase.

SSZ: sulfasalazine.

TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity.

TNF : tumor necrosis factor.

TX: thromboxanes.

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1.

VEGF: vascular endothelial growth factor.

VLA-4: verylate antigen-4.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
---------------------------	---

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Inflammation et stress oxydant	3
1. Inflammation.....	3
2. Stress oxydant.....	14
3. Interdépendance inflammation/stress oxydant.....	19
II. Arthrite rhumatoïde	22
1. Epidémiologie.....	22
2. Etiologie et pathogénie.....	22
3. Physiopathologie de l'arthrite rhumatoïde.....	26
4. Traitement de l'arthrite rhumatoïde.....	28
5. Thérapies complémentaires.....	32
6. Modèles expérimentaux de l'arthrite rhumatoïde.....	34
III. Substances naturelles bioactives	37
1. Terpènes.....	38
2. Alcaloïdes.....	42
3. Polyphénols.....	46
IV. <i>Hertia cheirifolia</i>	51
1. Description et classification botanique.....	51
2. Usage traditionnel et activités biologiques.....	53
3. Composition chimique.....	54

V. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel.....	55
1.1. Matériel végétal.....	55
1.2. Animaux.....	55
2. Méthodes.....	56
2.1. Préparation des extraits.....	56
2.2. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes.....	58
2.2.1. Dosage des polyphénols.....	58
2.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	58
2.3. Analyse par HPLC avec détecteur à barrettes de diode (HPLC-DAD).....	59

2.4. Etude de l'activité antioxydante.....	59
2.4.1. Effet scavenger du radical libre 2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl (DPPH [•]).....	59
2.4.2. Effet scavenger du radical ABTS ^{•+}	60
2.4.3. Pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP).....	60
2.4.4. Effet inhibiteur du blanchissement du β -carotène/acide linoléique.....	61
2.5. Etude de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	62
2.5.1. Modèle de l'œdème de l'oreille induit au PMA.....	62
2.5.2. Modèle de l'œdème de l'oreille induit à l'huile de croton.....	63
2.5.3. Modèle de l'œdème de la patte induit à la carragénine.....	64
2.5.4. Modèle de l'arthrite rhumatoïde induite à l'adjuvant complet de Freund.....	64
3. Analyse statistique.....	69

VI. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etude phytochimique de <i>Hertia cheirifolia</i>	70
1.1. Rendement de l'extraction.....	70
1.2. Contenu en polyphénols et en flavonoïdes totaux.....	71
1.3. Analyse par HPLC-DAD.....	76
2. Activité antioxydante.....	81
2.1. Activité anti-radicalaire.....	81
2.1.1. Effet neutralisant du radical libre DPPH [•]	81
2.1.2. Effet scavenger du radical libre ABTS ^{•+}	85
2.2. Pouvoir antioxydant réducteur du fer.....	90
2.3. Activité inhibitrice du blanchissement de la β -carotène/acide linoléique.....	94
3. Etude de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	98
3.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit au PMA chez la souris.....	98
3.2. Effet sur l'œdème de l'oreille induit à l'huile de croton chez la souris.....	101
3.3. Effet sur l'œdème de la patte induit à la carragénine chez le rat.....	105
4. Activité anti-arthrite induite à l'adjuvant complet de Freund chez le rat.....	114
4.1. Effet sur les paramètres cliniques.....	114
4.2. Effet sur les paramètres plasmatiques.....	123
4.3. Effet sur la structure histologique.....	133
Conclusion et perspectives	141
Références bibliographiques	143

Annexes

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales sont de plus en plus reconnues pour leurs bienfaits pour la santé humaine. De nos jours, la découverte de nombreuses molécules bioactives issues de milliers d'espèces de ces plantes représente une source biogénique importante pour le développement pharmaceutique. Ces molécules bioactives sont des métabolites secondaires produits par différentes espèces formant une grande famille de composés naturels de structures chimiques très diversifiées, dont les polyphénols qui sont dotés de nombreuses propriétés pharmacologiques, attribuées principalement à leurs activités antioxydante et anti-inflammatoire.

Par ailleurs, des études récentes ont montré que le stress oxydant est fortement impliqué dans le développement et la perpétuation de l'inflammation, contribuant à l'apparition et/ou au maintien de nombreuses pathologies, telles que l'arthrite rhumatoïde, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique des articulations aboutissant à une destruction sévère de l'os et du cartilage. Différentes thérapies sont utilisées dans le traitement de l'AR mais leur efficacité reste limitée et de nombreux effets secondaires sont observés surtout à long terme. La médecine alternative est à cet effet une approche prometteuse pour la thérapie antiarthritique, grâce aux extraits naturels de plantes. En effet, différentes plantes médicinales ont été étudiées dans la thérapie de l'AR, où une réduction de la douleur et de l'inflammation ont été clairement démontrées. De plus, différents modèles expérimentaux ont été développés chez les rongeurs pour une meilleure compréhension du mécanisme pathogénique de l'AR ainsi que pour l'évaluation des effets de nouvelles molécules thérapeutiques.

L'objectif principal de notre travail est d'évaluer et de mettre en évidence les activités antiinflammatoires et antiarthritiques des extraits d'une plante médicinale endémique du bassin méditerranéen (*Hertia cheirifolia* L.). Les différentes parties de la plante (feuilles, tiges, fleurs et racines) ont été mises à l'étude dans le but de valoriser leurs différents extraits et afin de comparer les propriétés de ces différentes parties. L'objectif de notre étude se décline en trois parties principales :

- Analyse phytochimique des extraits méthanoliques de *H. cheirifolia*
- Etude de l'activité antioxydante *in vitro* : évaluation de l'activité anti-radicalaire, analyse du pouvoir réducteur du fer et de l'effet anti-péroxydation lipidique.
- Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* en utilisant deux modèles animaux : souris et rats. Cette partie du travail vise à chercher l'activité anti-inflammatoire aiguë (œdème de l'oreille induit au PMA et à l'huile de croton chez la souris et œdème de la patte induit à la carragénine chez le rat) et chronique (modèle de l'arthrite rhumatoïde induite à l'adjuvant de Freund chez le rat).

Première partie :

Revue bibliographique

I. Inflammation et stress oxydant

CHAPITRE I. INFLAMMATION ET STRESS OXYDANT

Il est de plus en plus reconnu que le stress oxydant joue un rôle important dans le développement et la perpétuation de l'inflammation, contribuant ainsi au développement de nombreuses pathologies chroniques, tels que les maladies cardiovasculaires, le diabète, les maladies neurodégénératives et le cancer (Lugrin *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2016 ; Jha *et al.*, 2018).

1. Inflammation

L'inflammation est un processus fondamental de défense naturelle développé par le système immunitaire contre toute agression étrangère. Elle permet également de remplacer les tissus endommagés par cicatrisation afin de restaurer l'homéostasie cellulaire (Medzhitov, 2010 ; Kotas et Medzhitov, 2015). L'inflammation est un processus dynamique et organisé orchestré par des éléments vasculaires, cellulaires et humoraux. Les principaux événements survenant lors de l'inflammation sont la modification de la perméabilité vasculaire, le chimiotactisme des leucocytes et la libération de médiateurs inflammatoires (Kotas et Medzhitov, 2015 ; Abdulkhaleq *et al.*, 2018).

La réponse inflammatoire peut être aiguë ou chronique suivant chacune un mécanisme particulier. L'inflammation aiguë est caractérisée par une vasodilatation locale, une extravasation et une migration trans-endothéliale des neutrophiles et des monocytes circulants dans le site inflammatoire (Medzhitov, 2010 ; Chen *et al.*, 2018). Une inflammation aiguë incontrôlée peut évoluer vers une inflammation chronique, caractérisée par une infiltration lymphocytaire importante, une prolifération des fibroblastes et une formation des fibres de collagène (Hardbower *et al.*, 2013).

En présence d'un stimulus inflammatoire, les cellules immunitaires sont activées et sécrètent des cytokines et des chimiokines ainsi que des médiateurs lipidiques jouant le rôle de chimiotactisme et d'activation séquentielle des cellules inflammatoires (Medzhitov, 2010 ; Turner *et al.*, 2014 ; Kotas et Medzhitov, 2015), (**Figure 1**).

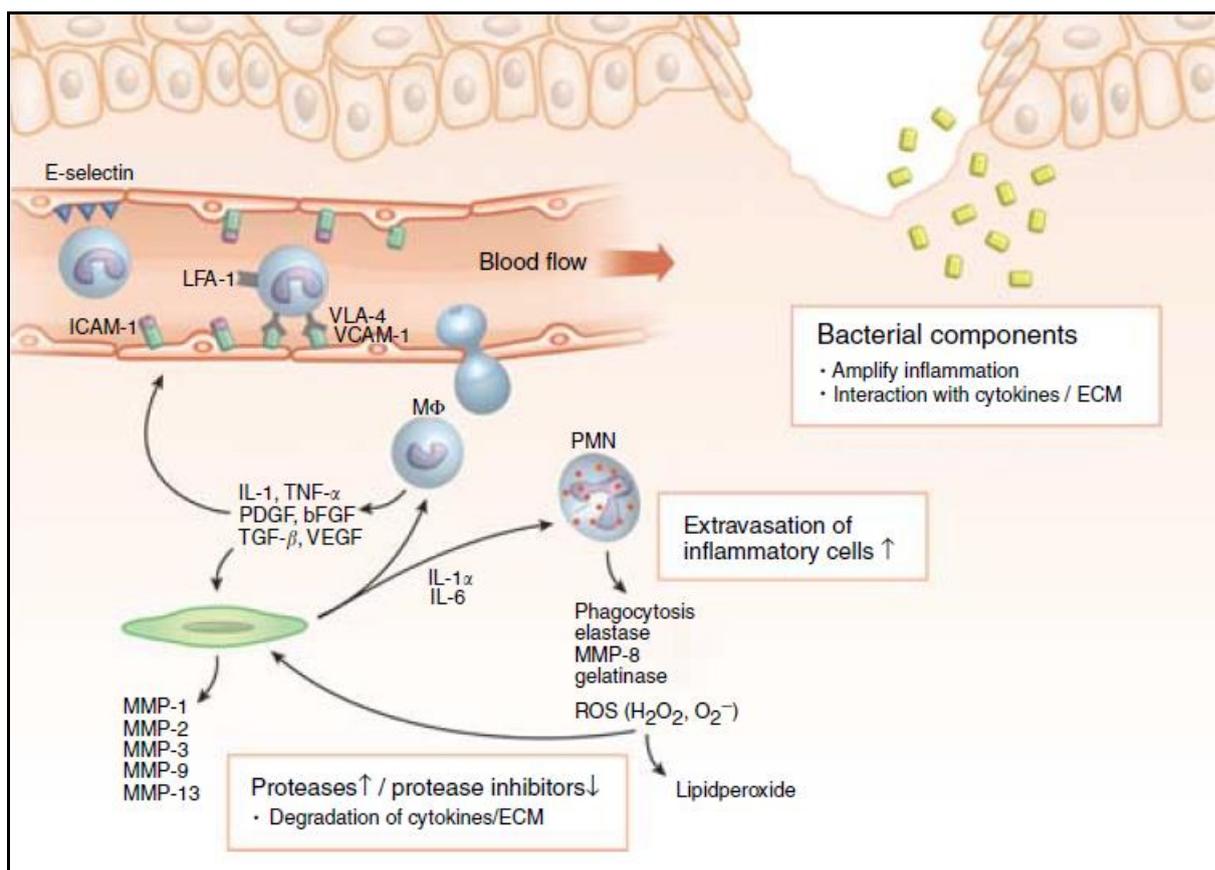


Figure 1. Principaux médiateurs inflammatoires cellulaires et humoraux (IL- : interleukine ; MMP- : métalloprotéases matricielles ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes, bFGF : facteur de croissance basique des fibroblastes ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ; ECM : matrice extracellulaire ; ICAM-1 : molécule d'adhérence intercellulaire ; LFA-1 : Antigène 1 associé à la fonction de lymphocyte ; VLA-4 : antigène d'activation très tardif-4 ; VCAM-1 : molécule d'adhérence 1 des cellules vasculaires ; Mφ : macrophage ; PMN : polymorphonucléaire), (Eming *et al.*, 2007).

1.1. Médiateurs humoraux de l'inflammation

1.1.1. Amines et peptides vasoactifs

L'histamine et la sérotonine sont deux amines vasoactives, secrétées principalement par les mastocytes activés. Elles sont responsables de la vasodilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, et permettent ainsi le maintien de la phase aiguë de la réponse inflammatoire (Abdulkhaleq *et al.*, 2018). Elles sont par ailleurs, impliquées dans l'hypersensibilité, favorisant les symptômes d'allergie (rougeur et urticaire) et contribuent à la cicatrisation (Shajib et Khan, 2015). Les kinines (bradykinines), produites par les tissus lors de l'inflammation par clivage protéolytique de l' α_2 globuline, sont également des hormones peptidiques vasoactives (Abdulkhaleq *et al.*, 2018).

1.1.2. Métabolites lipidiques

Les écosanoïdes sont des médiateurs lipidiques à 20 carbones, produits principalement du métabolisme de l'acide arachidonique, libéré de la membrane plasmique sous l'action de la phospholipase A2 (PLA₂). Leur synthèse est catalysée principalement par les cyclooxygénases (COX-2) et les lipooxygénases (5-LOX), (Hanna et Hafez, 2018 ; Venkatesha *et al.*, 2018). Les plus connus des écosanoïdes sont les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) et les leukotriènes (LT). Ils sont produits par la majorité des cellules inflammatoires et par l'endothélium vasculaire activés (Hirata et Narumiya, 2012 ; Mashima et Okuyama, 2015). Les PG, en particulier PGE₂, contribuent avec les amines vaso-actives à l'augmentation du flux sanguin *in situ*, et stimulent la réponse à la douleur en plus de leur rôle pyrogène. Les leukotriènes B₄ (LTB₄), représentant un important des LT, est un facteur chimio-attractant des neutrophiles et des monocytes, et stimule la sécrétion des cytokines par les

leucocytes activés et de l'histamine par les mastocytes (Hirata et Narumiya, 2012 ; Mashima et Okuyama, 2015).

Le facteur activateur des plaquettes (PAF) est un autre médiateur dérivé des phospholipides membranaires. Il est produit par les mastocytes, les plaquettes et les neutrophiles. Il intervient dans la phase précoce de la réponse inflammatoire, *via* l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Bitencourt *et al.*, 2013).

1.1.3. Cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines produites par divers types cellulaires activés. Elles agissent seules ou en synergie afin de maintenir et d'amplifier la réponse inflammatoire (Turner *et al.*, 2014). Le facteur de nécrose tumorale (TNF α) et les interleukines IL-1 et IL-17 sont les plus importantes des cytokines pro-inflammatoires. Elles interviennent particulièrement dans la phase aiguë de la réponse inflammatoire par activation du chimiotactisme cellulaire et par stimulation du foie à sécréter des protéines, dites de phase aiguë. De plus, elles activent la prolifération des LT et LB et la cytotoxicité des NK (Ashley *et al.*, 2012 ; Turner *et al.*, 2014 ; Chen *et al.*, 2017).

Les interférons (IFNs) sont par ailleurs des cytokines à activité antivirale. L'IFN γ produite par les macrophages et les lymphocytes, est un stimulateur potentiel de la réponse inflammatoire (Th-1), (Ashley *et al.*, 2012 ; Lopusna *et al.*, 2013). Les chimiokines, telle que l'IL-8, sont des cytokines chimiotactiques produites sous l'influence des pathogènes ou des cytokines. Elles activent le chimiotactisme des neutrophiles et des monocytes vers le site inflammatoire, et stimulent les basophiles et les mastocytes à sécréter l'histamine (Jin *et al.*, 2008). Les facteurs de croissance hématopoïétiques notamment GM-CSF, sont également impliqués *via* la

stimulation de l'expansion clonale des granulocytes et des monocytes dans la moelle osseuse (Shiomi et Isui, 2015).

1.1.4. Système du complément

Le système du complément est un ensemble de protéines synthétisées par le foie sous l'influence des cytokines pro-inflammatoires. Il joue un rôle important dans l'élimination des pathogènes et agit à l'interface de l'immunité innée et adaptative (Dunkelberger et Song, 2010 ; Lubbers *et al.*, 2017). Son activation est déclenchée suite à une cascade de réactions enzymatiques séquentielles aboutissant à l'opsonisation puis à la lyse des pathogènes. Le complément contribue à la réaction inflammatoire par élimination des complexes immuns et des cellules apoptotiques. De plus, les peptides dérivés de l'activation du complément (C3a, C4a et C5a) sont capables d'augmenter la perméabilité vasculaire, d'activer les leucocytes et de stimuler la dégranulation des mastocytes (Dunkelberger et Song, 2010 ; Lubbers *et al.*, 2017).

1.1.5. Radicaux libres

Les radicaux libres sont reconnus pour leur rôle dans la défense contre les pathogènes et comme médiateurs inflammatoires. En effet, les cellules phagocytaires sont capables de produire des anions superoxyde (O_2^-) à activité bactéricide, par réduction de grandes quantités d'oxygène moléculaire (O_2) (explosion respiratoire), *via* la NADPH oxydase (Halliwell, 2006 ; Mittal *et al.*, 2014). Par ailleurs, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut interagir avec l'anion superoxyde (O_2^-) d'une part et avec le chlorure, substrat de la MPO, d'autre part, formant ainsi le radical hydroxyle (OH^-) et l'acide hypochloreux ($OHCl$) à effet microbicide important (Mittal *et al.*, 2014 ; Kato, 2016).

Le monoxyde d'azote (NO) est aussi un radical libre, potentiellement impliqué dans la défense antimicrobienne, antivirale et dans la régulation de la réponse inflammatoire. L'isoforme inductible de la NOSynthase (iNOS) est fortement exprimée en réponse à des stimuli pro-inflammatoires (bactéries, virus, TNF α , IFN γ) d'où une production importante du NO (Lind *et al.*, 2017). Les radicaux libres jouent également le rôle de second messager dans la réponse inflammatoire par activation de l'expression de gènes codant des cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion leucocytaire (Zhang *et al.*, 2016).

1.2. Médiateurs cellulaires de l'inflammation

La réponse inflammatoire fait intervenir différents types cellulaires du système immunitaire. Les cellules épithéliales et endothéliales du site inflammatoire sont également impliquées (Luscinskas *et al.*, 2015 ; Chen *et al.*, 2017).

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont les cellules principales intervenant au premier stade de la réponse inflammatoire aiguë. Attirés par chimiotactisme, les neutrophiles activés sécrètent le contenu de leurs granules cytoplasmiques, aboutissant à la destruction des pathogènes. Les neutrophiles produisent également de grandes quantités de radicaux libres, toxiques pour les pathogènes (Nathan, 2006 ; Prame Kumar *et al.*, 2018).

Les macrophages, sont des phagocytes résidents dans les tissus et interviennent au second rang après les neutrophiles dans la réponse inflammatoire. De nouveaux macrophages sont recrutés par chimiotactisme des monocytes circulants dans le site inflammatoire. Ils sont activés par les cytokines et endotoxines et jouent un rôle primordial dans la phagocytose des pathogènes, des débris cellulaires et des cellules apoptotiques résultant de la réaction inflammatoire (Abdulkhaleq *et al.*, 2018 ; Kumar *et al.*, 2018). Les macrophages sont par

ailleurs, un acteur prépondérant de la régulation et de la résolution inflammatoire (Sugimoto *et al.*, 2016; Sugimoto *et al.*, 2019).

Les éosinophiles et les basophiles sont d'autres granulocytes sécrétant des enzymes lytiques lors de la réponse inflammatoire. Ils produisent de l'héparine, la sérotonine et des médiateurs lipidiques favorisant la vasodilatation. Les mastocytes quant à eux, sont des cellules résidentes dans les tissus conjonctifs et à la surface des épithéliums. Elles sécrètent de l'histamine, des protéases, en plus d'une variété de cytokines. Les mastocytes, éosinophiles et basophiles sont retrouvés le plus souvent dans l'inflammation allergique (Stone *et al.*, 2010 ; Metcalfe *et al.*, 2016).

Les plaquettes sont aussi rapidement accumulées dans le site inflammatoire et contribuent à la réponse inflammatoire. En plus de leur rôle dans la coagulation, elles sont capables de libérer des médiateurs vasodilatateurs (héparine et sérotonine) dans la phase vasculaire inflammatoire aiguë (Aggrey *et al.*, 2013).

Les lymphocytes, bien qu'ils soient des effecteurs spécifiques de l'immunité adaptative, ils peuvent contribuer à la réponse inflammatoire aiguë suite à une production importante de cytokines et des molécules d'adhésion. Les LT CD8⁺ activés agissent par cytotoxicité, tandis que les LB différenciées en plasmocytes sécrètent des anticorps en coopération avec les LT CD4⁺. Les LT et LB produisent une variété de cytokines qui contribuent au chimiotactisme cellulaire et à l'activation d'autres cellules. L'infiltration lymphocytaire reste cependant, une caractéristique de l'inflammation chronique (Chen *et al.*, 2017).

1.3. Voies de signalisation inflammatoire

La réponse inflammatoire est déclenchée suivant différentes voies de signalisation, activées par des motifs moléculaires associés aux pathogènes (pathogen associated molecular patterns : PAMPs) ou par des motifs moléculaires associés au danger (damage associated molecular patterns : DAMPs) résultant du stress endogène (Chen *et al.*, 2017), (**Figure 2**).

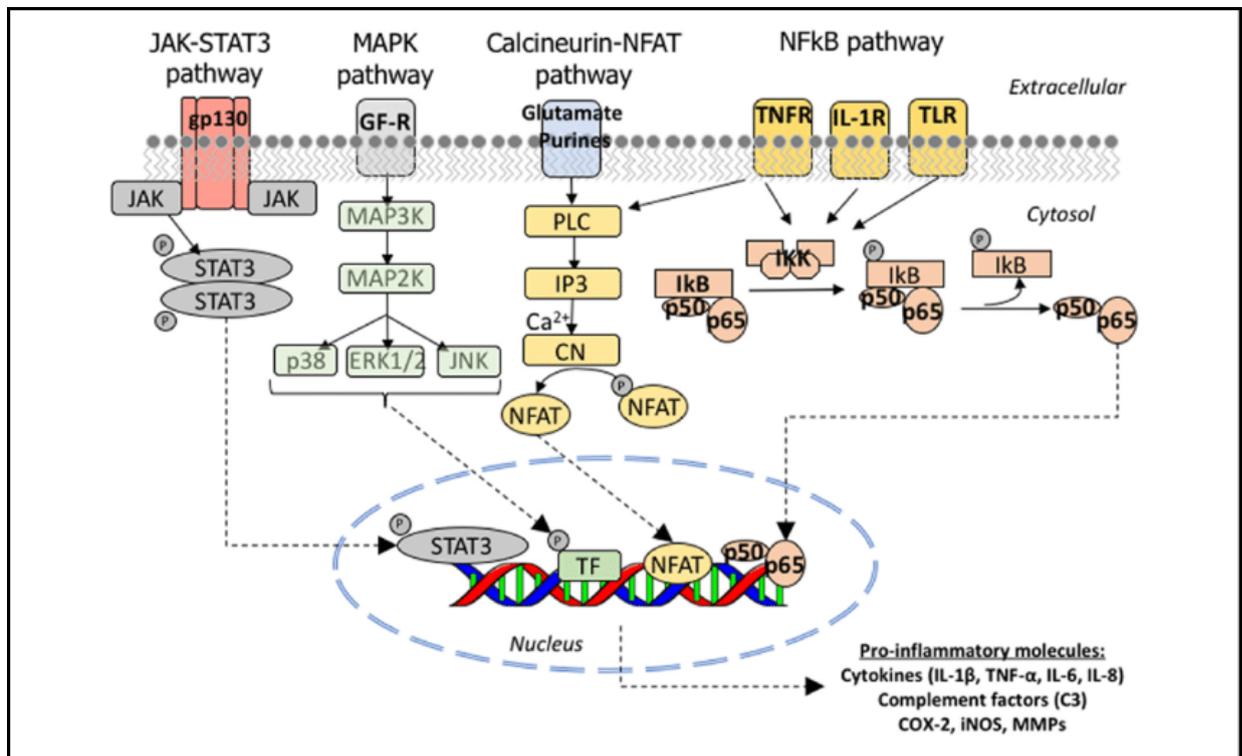


Figure 2. Voies de signalisation moléculaire pro-inflammatoire. NFkB : « nuclear factor kappa-B » ; MAPK : « mitogen activating protein kinase » ; JAK/STAT : « Janus kinase/signal transducers and activators of transcription »), (Perez-Nievas et Serrano-Pozo, 2018).

1.3.1. Voie du NFκB

Le NFκB est un facteur de transcription clé dans la réponse immunitaire, il est composé de cinq membres ; P50, p52, RelA (p65), RelB et c-Rel. En situation physiologique, le NFκB est sous forme hétérodimère inactive (p65/p50), il est séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur IκB (Lawrence et Fong, 2010). Une fois un signal extracellulaire activateur est transmis *via* cette voie, une IκB kinase (IKK) est activée et assure la phosphorylation de l'IκB afin de libérer le NFκB. L'IκB phosphorylé est ubiquitinylé puis dégradé par le protéasome et le NFκB activé subit une translocation nucléaire où il active la transcription de gènes codant pour des molécules pro-inflammatoires (Abdulkhaleq *et al.*, 2018 ; Perez-Nievas et Serrano-Pozo, 2018).

1.3.2. Voie des MAPK

Les « Mitogen Activating Protein Kinase » (MAPK) sont une famille de protéines sérine/thréonine kinases, activées en réponse à une variété de stimuli, notamment les cytokines inflammatoires (TNFα, IL-6 et IL-1). La p38MAPK est l'une des plus étudiée en raison de son expression ubiquitaire. Son activation aboutit à la phosphorylation du facteur de transcription p38 dans le cytoplasme ou dans le noyau initiant ainsi la réponse inflammatoire *via* différents facteurs de transcription (Abdulkhaleq *et al.*, 2018 ; Perez-Nievas et Serrano-Pozo, 2018).

1.3.3. Voie des JAK-STAT

Les Janus-Kinases (JAK 1, 2, 3 et Tyk2) sont des tyrosines kinases associées aux domaines intracellulaires des récepteurs des cytokines. La voie JAK/STAT est activée par différents cytokines et facteurs de croissance contrôlant l'expression de certains gènes.

Les récepteurs associés aux JAK ainsi activés, déclenchent une cascade de phosphorylation aboutissant à la mise en évidence de sites de fixation cytoplasmiques des STAT (1, 2, 3, 4, 5 ou 6), « Signal Transducers and Activators of Transcription ». Ces STAT entament à leur tour une série de phosphorylations au niveau des résidus tyrosine, essentielle à leur dimérisation en homo- ou en hétérodimères, puis leur translocation nucléaire et liaison aux régions promotrices de gènes cibles en association à d'autres facteurs de transcription (O'Shea *et al.*, 2015 ; Perez-Nievas et Serrano-Pozo, 2018).

1.3.4. Voie de Calcineurine/NFAT

La calcineurine (CaN) est une sérine/thréonine protéines phosphatase calcium/calmoduline dépendante, activée suite à la liaison du calcium et de la calmoduline à son site d'activation. La CaN activée agit sur le facteur de transcription NFATc « Nuclear Factor of Activated T cells », dont la déphosphorylation aboutit à sa translocation nucléaire. Cette voie est particulièrement impliquée dans l'activation des LT. Le NFATc cible les gènes des cytokines (IL-2), des facteurs de croissance, de leurs récepteurs et des protéines d'adhésion cellulaire (Perez-Nievas et Serrano-Pozo, 2018 ; Sun *et al.*, 2019).

1.4. Résolution de l'inflammation

Une régulation adéquate des mécanismes inflammatoires est essentielle pour prévenir une amplification incontrôlable de l'inflammation et le développement de pathologies chroniques (Kotas et Medzhitov, 2015 ; Chen *et al.*, 2017). La résolution de l'inflammation est un processus organisé et régulé permettant de supprimer la réponse inflammatoire, grâce à une production contrôlée des médiateurs solubles, d'où un moindre chimiotactisme et une moindre activation des cellules inflammatoires (Headland et Norling, 2015 ; Sugimoto *et al.*, 2016).

C'est un processus assuré par les macrophages qui, après production des prostaglandines et des leucotriènes, vont rapidement produire les lipoxines, protéines spécialisées de la résolution inflammatoire, bloquant ainsi le recrutement des neutrophiles (Lugrin *et al.*, 2014 ; Serhan *et al.*, 2014).

Les médiateurs pro-résolvants spécialisés (MPS), notamment lipidiques (lipoxines, résolvines, protectines et marésines), créent l'équilibre entre les réponses pro-et anti-inflammatoires afin d'atteindre un état d'homéostasie (Lugrin *et al.*, 2014 ; Serhan *et al.*, 2014). D'une part, ils assurent une limitation de l'infiltration tissulaire et l'induction de l'apoptose des neutrophiles puis leur efferocytose par les macrophages. D'autres part, ils stimulent les cellules immunosuppressives (M2, LTh-2 et LTreg), afin de limiter l'inflammation locale et induisent finalement la réparation tissulaire marquant la fin de la résolution (Sugimoto *et al.*, 2016 ; Sugimoto *et al.*, 2019).

Les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'activation de la réponse inflammatoire préparent également sa résolution. Le NFκB joue un rôle important dans l'initiation de la résolution inflammatoire. En effet, la régulation de l'expression des gènes pro-inflammatoires est liée aux dimères engagés dans la formation du NFκB (Lawrence et Fong, 2010 ; Liu *et al.*, 2017). L'expression et l'effet différentiels des sous unités du NFκB seraient directement liés à la régulation de la réponse inflammatoire. L'hétérodimère p65/p50 est la forme fonctionnelle prédominante active du NFκB à activité pro-inflammatoire, tandis que les formes p50/cRel, p65/cRel ou p50/p50 semblent être impliquées dans l'activation de gènes de la résolution et agissent en compétition avec l'hétérodimère p65/p50 pour se lier à l'ADN (Lawrence et Fong, 2010 ; Muxel *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017).

Les électrons libérés de la chaîne respiratoire sont capables de réduire l'oxygène moléculaire en anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), lequel avec un électron en plus donne du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci produit des radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) hautement réactifs et source des espèces réactives oxygénées (ERO), (Ozougwu, 2016 ; Quiñonez-Flores *et al.*, 2016). Le monoxyde d'azote est également produit au cours des réactions de la chaîne respiratoire et en conditions d'hypoxie. Il est responsable de la formation d'autres espèces hautement réactives appelées les espèces réactives azotées (ERA), (Phaniendra *et al.*, 2015 ; Ozougwu, 2017).

Une variété de molécules radicalaires et non radicalaires dérivant de l'oxygène moléculaire ou du monoxyde d'azote constituant les médiateurs du stress oxydant (**Tableau 1**).

Tableau 1. Médiateurs oxygénés et azotés du stress oxydant (Phaniendra *et al.*, 2015).

Espèces réactives oxygénées (ERO)	Espèces réactives azotées (ERA)
<i>Formes radicalaires</i>	<i>Formes radicalaires</i>
Anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)	Monoxyde d'azote (NO^{\cdot})
Radical hydroxyle (OH^{\cdot})	Dioxyde d'azote (NO_2^{\cdot})
Radical peroxyde (ROO^{\cdot})	<i>Formes non radicalaires</i>
Radical hydroxyperoxyde (HOO^{\cdot})	Peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$)
<i>Formes non radicalaires</i>	Acide peroxynitrique ($ONOOH$)
Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	Acide nitreux (HNO_2)
Oxygène singulet (1O_2)	Cation nitroxy (NO^+)
Acide hypochloreux ($HOCl$)	Anion nitroxy (NO^-)

2.2. Cibles moléculaires du stress oxydant

Une production massive et prolongée de radicaux libres est à l'origine de dommages importants des lipides, des protéines et des acides nucléiques. Ces dommages aboutissent à des altérations structurales et fonctionnelles irréversibles telles que des mutations somatiques et des transformations pré-néoplasiques et néoplasiques (Birben, 2012 ; Huang *et al.*, 2016).

2.2.1. Acides désoxyribonucléique/ribonucléique

Le radical OH[•] interagit directement avec l'ADN ou l'ARN et cause des cassures simple ou double brin aboutissant à la formation d'adduits des bases purine et pyrimidine et de la partie glucidique (Avery, 2011 ; Dizdaroglu et Jaruga, 2012). L'oxydation de l'ADN et/ou de l'ARN est directement liée au processus de mutagenèse, de carcinogénèse et du vieillissement (Avery, 2011 ; Kudryavtseva *et al.*, 2016).

2.2.2. Lipides

Le processus de peroxydation lipidique est déclenché lorsque les radicaux libres capturent un hydrogène des groupements méthyl (CH₃) des acides gras (LH) donnant lieu à la formation d'un radical lipidique (L[•]). Celui-ci peut interagir avec l'oxygène moléculaire et former des radicaux peroxydes (LOO[•]) (Avery, 2011 ; Phaniendra *et al.*, 2015). Deux produits toxiques finaux de la peroxydation lipidique seront ainsi formés ; le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxyl nonenal (4-HNA), (Ayala *et al.*, 2014).

2.2.3. Protéines

L'oxydation des protéines provoque leur fragmentation en chaînes polypeptidiques, leur déroulement ou un défaut de leur repliement, ce qui engendre une perte de leurs fonctions. De plus, l'oxydation des acides aminés donne lieu à la formation de dérivés carbonyles

responsables d'altérations irréversibles, marqueurs de plusieurs pathologies (Kumar *et al.*, 2015 ; Liguori *et al.*, 2018).

2.3. Antioxydants

Les antioxydants, sont des composés capables, à faibles concentrations, de prévenir la formation des radicaux libres et d'inhiber ou de retarder leur effet oxydant (Poljsak *et al.*, 2013 ; Manisha *et al.*, 2017).

2.3.1. Antioxydants endogènes

Plusieurs mécanismes de défense antioxydante sont présents dans différents compartiments cellulaires. Ce sont des antioxydants endogènes de nature enzymatique ou non enzymatique. Les trois enzymes principales qui assurent la défense antioxydante sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx), (Birben *et al.*, 2012 ; Pisoschi et Pop, 2015), (**Tableau 2**).

Tableau 2. Antioxydants endogènes (enzymatiques et non enzymatiques), (Birben *et al.*, 2012).

Antioxydants enzymatiques	Antioxydants non enzymatiques
<p><i>Superoxyde dismutase</i> (SOD)</p> $2\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	<p><i>Glutathion</i> (GSH)</p> $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}$
<p><i>Catalase</i> (CAT)</p> $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	<p><i>Protéines liant les métaux</i> (ferritine, lactoferrine, céruloplasmine et albumine).</p>
<p><i>Glutathion peroxydase</i> (GPx)</p> $\text{ROOH} + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$	<p><i>Acide urique</i> (C₅H₄O₃N₄)</p>

2.3.2. Antioxydants alimentaires

Les antioxydants exogènes proviennent de l'alimentation notamment des fruits et des légumes. Les plus importants sont les vitamines, les caroténoïdes et les polyphénols (Poljsak *et al.*, 2013 ; Manisha *et al.*, 2017).

2.3.2.1. Vitamines

L'acide ascorbique ou vitamine C est un antioxydant puissant capable de neutraliser les radicaux libres prévenant ainsi l'altération des biomolécules grâce à la formation de déhydroascorbate. La vitamine C intervient également en synergie avec le tocophérol (Vit E) dans l'élimination des radicaux lipophiles (peroxydes), (Du *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2014). Par ailleurs, l' α -tocophérol (vit E) est capable de neutraliser les radicaux peroxydes grâce à la formation de dérivés à faible réactivité envers les substrats lipidiques après conversion des radicaux peroxydes en hydroperoxydes (Hajibabaei, 2016 ; Kumar *et al.*, 2015).

2.3.2.2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments naturels protégeant les végétaux des dommages photo-oxydants. Chez l'homme, les caroténoïdes sont les précurseurs de la vitamine A (rétinol). Ils interagissent avec les radicaux libres suivant trois mécanismes ; transfert d'électrons aboutissant à la formation de radicaux caroténoïdes cationiques ou anioniques, capture d'atomes d'hydrogène formant un radical caroténoïde neutre ou la liaison à un radical libre (Fiedor et Burda, 2014 ; Young et Lowe, 2018).

2.3.2.3. Polyphénols

Les polyphénols sont capables de lutter contre le stress oxydant par différents mécanismes ; soit par suppression de la synthèse des ERO, ou par neutralisation des ERO ou encore par

stimulation d'autres mécanismes de défenses antioxydantes (Bendary *et al.*, 2013; Kumar et Pandney, 2013). Les acides phénoliques sont de puissants antioxydants capables de neutraliser l'acide hypochloreux et de réduire la peroxydation lipidique (Khan *et al.*, 2016 ; Liang et Kitts, 2016). Par ailleurs, les flavonoïdes protègent les cellules des dommages causés par les LDL oxydées grâce à l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines et sont également des inhibiteurs des cyclooxygénase et lipooxygénase (COX et LOX) (Kumar et Pandey, 2013 ; Panche *et al.*, 2016).

3. Interdépendance inflammation/stress oxydant

Différentes études ont montré que l'inflammation et le stress oxydant sont étroitement liés (Mittal *et al.*, 2014 ; Biswas, 2016 ; Jha *et al.*, 2018). Durant la réponse inflammatoire, les phagocytes activées sécrètent des substances réactives oxygénées, azotées et chlorées tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical hydroxyle (OH⁻), le monoxyde d'azote (NO), et l'acide hypochloreux (HOCl), dans le but d'éliminer les pathogènes (Halliwell, 2006 ; Mittal *et al.*, 2014 ; Aratani, 2018). La production de ces espèces réactives devient plus importante en cas d'une réponse inflammatoire chronique, conduisant à la perpétuation de l'inflammation et au développement de pathologies chroniques (Hardbower *et al.*, 2013 ; Mittal *et al.*, 2014).

Les cellules inflammatoires activées produisent également des cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α , IL-1 et IL-6), qui stimulent de façon réciproque la production des ERO par les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales. Ceci correspond à une boucle de rétrocontrôle positif entre les médiateurs inflammatoires et oxydants respectivement (Castellani *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2015).

En situation de stress oxydant, une production excessive des ERO est capable de stimuler l'inflammation par deux mécanismes principaux. D'une part, une oxydation aberrante des biomolécules (lipides, protéines et acides nucléiques) les rend pro-inflammatoires et l'altération de la structure des protéines impliquées dans la régulation de la réponse inflammatoire, affecte directement leur fonction et aboutit au développement du processus inflammatoire chronique (Hardbower *et al.*, 2013 ; Halliwell, 2013). D'autre part, les ERO et/ou ERA générées, jouent un rôle activateur des cascades de signalisation inflammatoire. Ils sont capables d'activer les kinases (PKC, JNK, MAPK), enzymes clés des différentes voies inflammatoires, responsables de l'activation des facteurs de transcription. Ces facteurs, après translocation dans le noyau, stimulent l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6), (Mittal *et al.*, 2014).

La voie du NF κ B est également activée par les ERO, *via* la stimulation de la phosphorylation de l'I κ B par les kinases (I κ K) aboutissant à sa dégradation et à la libération du facteur de transcription NF κ B. Celui-ci stimule, seul ou avec d'autres facteurs de transcription, l'expression de différents gènes codant pour des protéines inflammatoires (Valin et Pablos, 2015 ; Verstrepen et Beyaert, 2014).

Bien que la séquence des événements des deux processus soit complexe, il apparaît que l'inflammation et le stress oxydant sont interdépendants et intimement liés notamment lors des processus pathologiques. Les médiateurs inflammatoires libérés sous stimulation du stress oxydant favorisent l'inflammation. A l'encontre de cela, l'inflammation *via* les ERO libérés et d'autres substances oxydantes favorise le stress oxydant et les dommages cellulaires. Un cercle vicieux entre le stress oxydant et l'inflammation est alors mis en place (Lugrin *et al.*, 2014 ; Biswas, 2015 ; Jha *et al.*, 2018), (**Figure 4**).

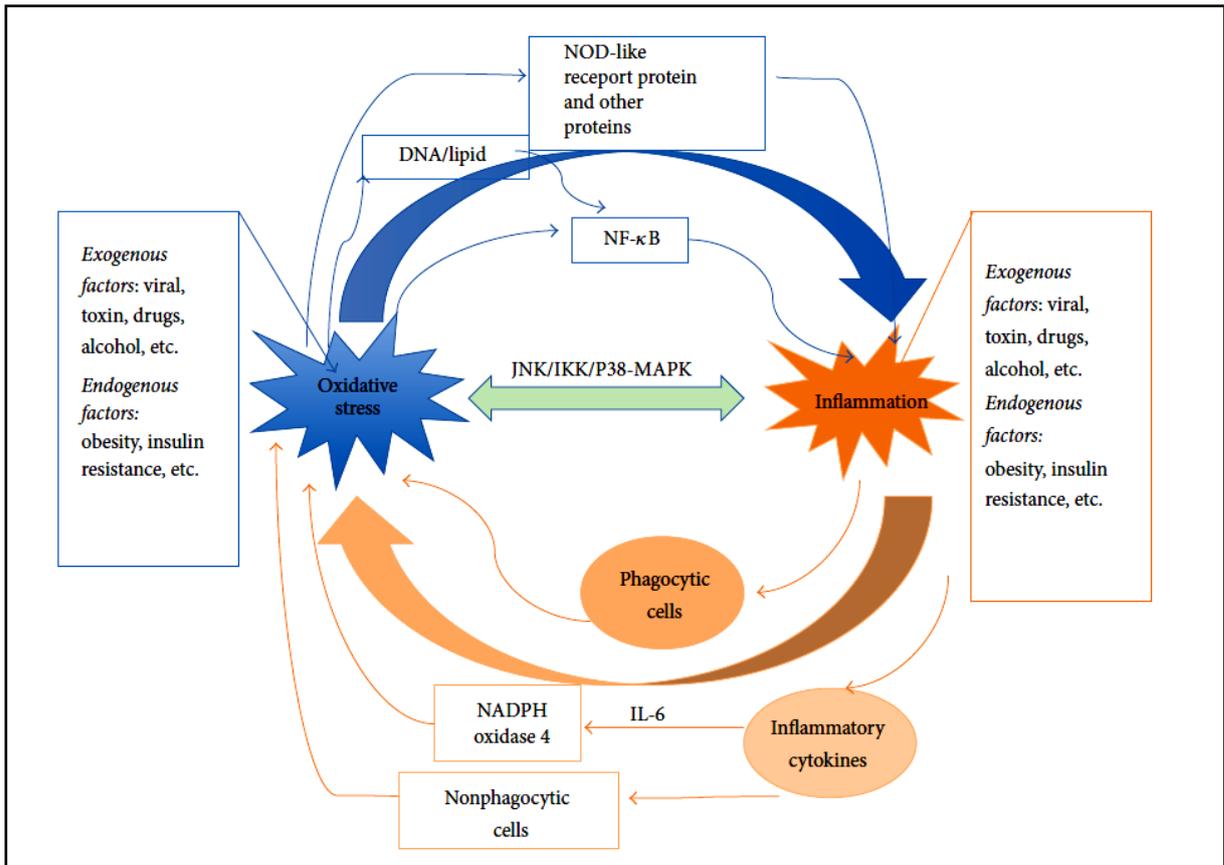


Figure 4. Interaction potentielle entre le stress oxydant et l'inflammation (Li *et al.*, 2016).

II. Arthrite rhumatoïde

CHAPITRE II. ARTHRITE RHUMATOÏDE

1. Epidémiologie

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une pathologie inflammatoire auto-immune systémique affectant ~1% de la population dans le monde. Plus des trois quarts (3/4) de la population arthritique sont des femmes, d'où un facteur de risque lié au sexe en plus d'une prédominance chez les personnes âgées (Alpizar-Rodriguez *et al.*, 2017 ; Smolen *et al.*, 2016 ; Guo *et al.*, 2018). L'AR se manifeste par une inflammation chronique de l'articulation aboutissant à une destruction progressive de l'os et du cartilage (Picerno *et al.*, 2015 ; Smolen *et al.*, 2016).

Deux formes majeures de l'AR sont distinguées, selon la présence ou non d'anticorps anti-protéines citrullinées (ACPA) ; la forme séropositive (ACPA-positif) et la forme séronégative (ACPA-négative). Le profil clinique de l'AR ACPA-positif est plus agressif que l'AR ACPA-négative (Malmstrom *et al.*, 2017). Néanmoins, un taux élevé des auto-anticorps circulants (facteur rhumatoïde, ACPA et anticorps anti-protéines carbamylées) est souvent observé plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes ; c'est la phase préclinique de l'AR (Deane et El-Gabalawi, 2014 ; Demoruelle *et al.*, 2014 ; Smolen *et al.*, 2016).

2. Etiologie et pathogénie

L'étiologie de l'AR est multifactorielle, due à une interaction complexe entre des facteurs génétiques et environnementaux et le développement d'une réponse auto-immune chronique (**Figure 5**). L'ensemble de ces événements aboutit à une hyperplasie synoviale, un gonflement et une déformation de l'articulation en plus d'une destruction de l'os et une inflammation systémique (Picerno *et al.*, 2015; Deane *et al.*, 2017).

L'auto-réactivité des ACPA, associée à des facteurs génétiques et environnementaux est l'étape clé dans la pathogenèse de l'AR. Elle est caractérisée par une réponse immune aberrante envers les protéines du soi ayant subi des modifications post-traductionnelles, impliquant l'activation du complément, des ostéoclastes et des chondrocytes contribuant ainsi à la progression de la pathologie (Smolen *et al.*, 2016 ; Firestein et Mclennes, 2017 ; Guo *et al.*, 2018).

2.1. Facteurs génétiques

Le facteur de risque génétique le plus important de l'AR est lié aux gènes codant le système du HLA-II. C'est un ensemble d'allèles du HLA-DR (HLA-DR1 et HLA-DR4) codant des séquences d'acides aminés déterminant la structure des poches d'ancrage de peptides antigéniques appelées, épitopes de susceptibilité (ES) (Deane *et al.*, 2017 ; Firestein et Mclennes, 2017). Les allèles HLA-DR sont présents chez 70% des patients atteints de l'AR contre seulement 30% chez les sujets sains. Les patients atteints de l'AR présentent au moins une des variantes génotypiques suivantes : DRB*0401, DRB*0404, DRB*0101, et DRB*1402 de l'allèle HLA-DR, considérées actuellement comme marqueur de risque important d'atteinte par l'AR (Deane *et al.*, 2017 ; Firestein et Mclennes, 2017).

De plus, le risque de développer l'AR est plus important en cas d'antécédents familiaux. Ce qui est approuvé par la grande prévalence de cette pathologie chez les jumeaux homozygotes (12-15%) par rapport au reste de la population (~1%). Cette prévalence est d'environ 2-5% chez les sujets avec un lien familial de premier degré. Le facteur ethnique semble également être impliqué (Frisell *et al.*, 2016 ; Kuo *et al.*, 2018).

Il est reconnu que les molécules du HLA-DR lient les protéines citrullinées avec une grande avidité. La citrullination est une modification post-traductionnelle, correspondant à la conversion d'une arginine en une citrulline catalysée par la peptidyl arginine déiminase

(PADI). Cette citrullination rend la présentation des peptides antigéniques aux LT hautement efficace aboutissant à une production accrue des cytokines IL-17 et IFN γ , contrairement à des peptides non altérés, d'où une inflammation chronique et amplifiée (Scally *et al.*, 2013 ; Deane *et al.*, 2017). Le polymorphisme du gène PTPN22 (Protéine Tyrosine Phosphatase Non récepteur type 22) est un autre facteur génétique associé au développement de l'AR. Cette protéine contribuerait à une hyper-citrullination des peptides antigéniques en raison d'une interaction altérée avec l'enzyme PADI. Une activation excessive des LT est alors déclenchée (Wang *et al.*, 2013 ; Chang *et al.*, 2016).

2.2. Interaction facteurs génétiques et environnement

L'interaction des facteurs génétiques et environnementaux et du système immunitaire, au cours de la pathogenèse de l'AR, est à l'interface des muqueuses pulmonaires, orales et celles du tractus gastro-intestinal (Demoruelle *et al.*, 2014 ; Deane *et al.*, 2017), (**Figure 5**). La fumée de cigarette est l'un des facteurs prépondérants (20-30%) dans le développement de l'AR. En effet, l'inhalation des fumées de cigarette augmente considérablement l'expression de l'enzyme PADI dans les voies respiratoires favorisant ainsi la citrullination des protéines en plus d'autres altérations épigénétiques dont la méthylation, à potentiel inflammatoire considérable (Vassallo *et al.*, 2014 ; Meng *et al.*, 2017).

L'origine infectieuse et l'inflammation orale, notamment les parodontites, semblent être aussi étroitement liées au stade préclinique de l'AR. Trois agents pathogènes sont incriminés, *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) et l'Epstein Barr Virus (EBV), (Koziel *et al.*, 2014 ; König *et al.*, 2016 ; Blandraud et Roudier, 2018).

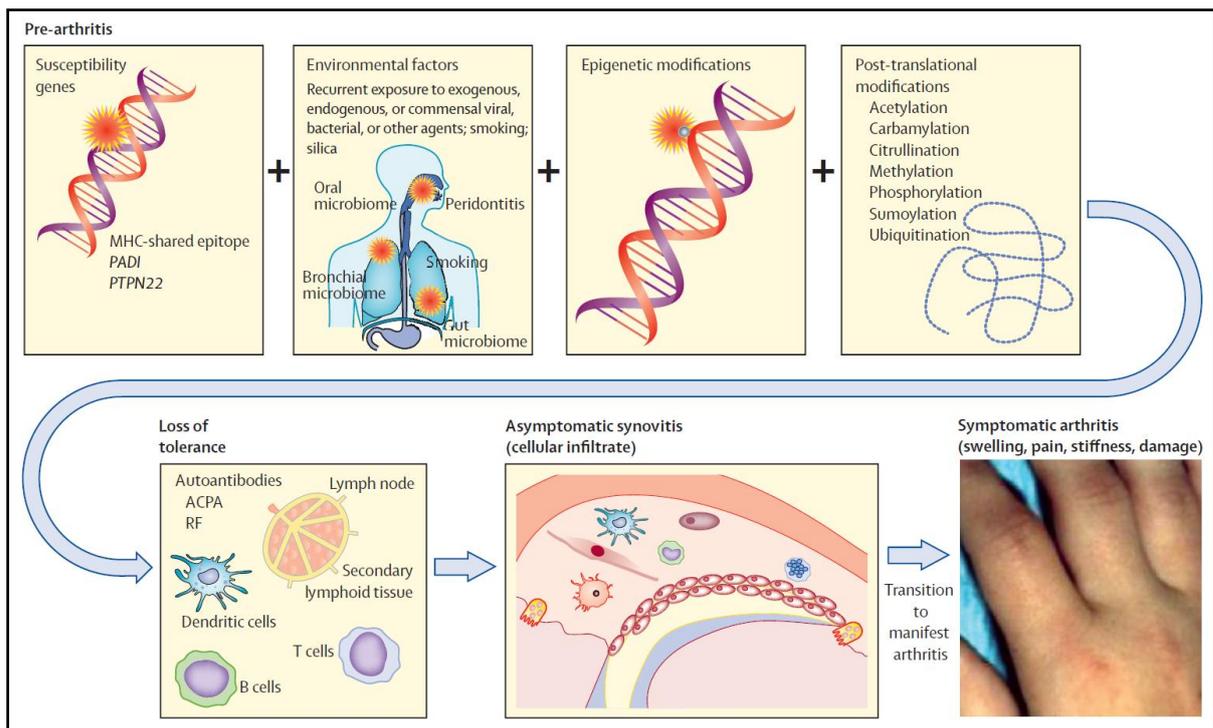


Figure 5. Etiologie multifactorielle et pathogénie de l'arthrite rhumatoïde (Smolen *et al.*, 2016).

Le microbiome intestinal serait également fortement lié à la pathogénèse de l'AR. Cette hypothèse est supportée par la dysbiose observée chez les patients arthritiques. D'autre part, les études expérimentales chez les rongeurs ont révélé que la susceptibilité et la sévérité de l'AR est nettement réduite dans un environnement « germ free » (Liu *et al.*, 2016 ; Wu *et al.*, 2016). Les bactéries commensales joueraient donc un rôle adjuvant à l'auto-immunité en altérant l'immunorégulation intestinale. Un régime alimentaire sain serait dans ce cas bénéfique grâce à la consommation de la vit D, des antioxydants et des acides gras omega-3 (He *et al.*, 2016 ; Gan *et al.*, 2017).

3. Physiopathologie de l'arthrite rhumatoïde

L'AR est une pathologie hétérogène qui évolue progressivement suivant différentes phases, aboutissant aux symptômes caractéristiques de l'AR (**Figure 6**).

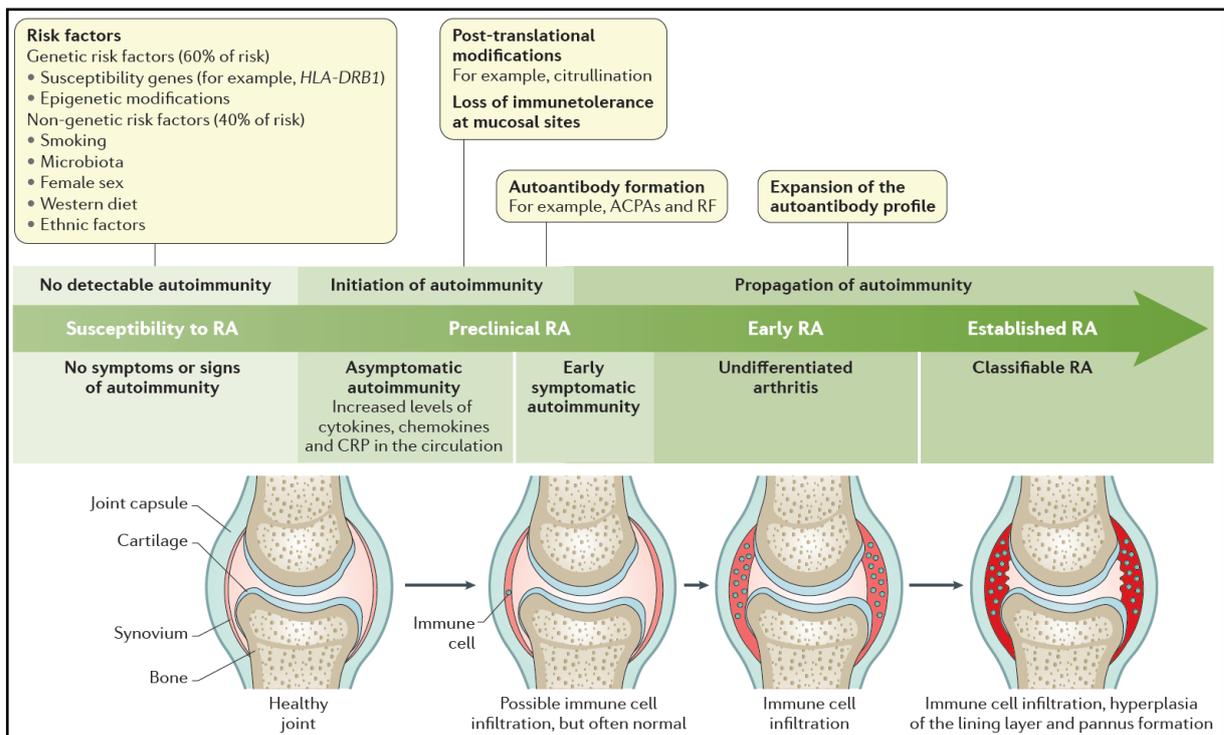


Figure 6. Développement et progression de l'arthrite rhumatoïde (Smolen *et al.*, 2018).

3.1. Hyperplasie synoviale

En situation normale, les synoviocytes fibroblastes-like (SFL), assurent la fonction et la lubrification de l'articulation grâce à la sécrétion de l'acide hyaluronique et la lubricine. En cas d'AR, une hyperplasie synoviale est causée par une infiltration accrue de leucocytes activés dans le compartiment synovial (McInnes et Schett, 2011 ; Smolen *et al.*, 2016 ; Firestein et McInnes, 2017). Ces cellules produisent des médiateurs inflammatoires activant les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptative aboutissant à la sécrétion des ACPA.

Les ACPA se lient à diverses protéines citrullinées du soi, dont la vimentine, le fibrinogène et le collagène-II. Ils stimulent également la production des médiateurs pro-inflammatoires par les cellules immunitaires, tels que TNF α , IL-6 et IL-17A responsables de l'exacerbation et de la perpétuation de la synovite chronique (McInnes et Schett, 2011 ; Guo *et al.*, 2018).

3.2. Dommage du cartilage

L'hyperplasie synoviale est le facteur majeur du dommage du cartilage dans l'AR. Le synovium perd sa fonction protectrice du cartilage, suite à la réduction de l'expression de la lubricine. Les dommages du cartilage sont particulièrement induits par les métalloprotéases (MMP) sécrétées par les SFL responsables du désassemblage du collagène-II et de la dégradation du cartilage altérant ainsi la fonction biomécanique de l'articulation (McInnes et Schett, 2011 ; Pap et korb-Pap, 2015 ; Smolen *et al.*, 2018).

Par ailleurs, une régénération du cartilage devient très réduite dans les conditions inflammatoires synoviales (cytokines, radicaux libres et métalloprotéases). Le cartilage est donc progressivement dépourvu de chondrocytes qui meurent par apoptose aboutissant à un rétrécissement de la cavité articulaire (McInnes et Schett., 2011 ; Firestein et McInnes, 2017 ; Guo *et al.*, 2018).

3.3. Erosion de l'os

L'érosion de l'os péri-articulaire est le symptôme majeur de l'AR. Elle est associée à une inflammation prolongée par stimulation des ostéoclastes et suppression des ostéoblastes. Les cytokines inflammatoires (TNF α et IL-17), seraient capables d'amplifier l'activation et la différenciation des ostéoclastes supprimant ainsi la formation de l'os *via* des signaux tels que le « Receptor Activator of NF κ B Ligand » (RANKL) et le « Macrophage Colony Stimulating Factor » (M-CSF). Les ostéoclastes, grâce à leurs enzymes acides, détruisent le cartilage minéralisé et l'os sous-chondral

aboutissant à une résorption osseuse profonde (Schett et Gravallesse, 2012 ; Guo *et al.*, 2018 ; Smolen *et al.*, 2018).

Deux autres mécanismes auto-immuns sont possibles ; le premier *via* la formation des complexes immuns et le récepteur Fc stimulant la différenciation des ostéoclastes. Le second *via* les anticorps anti-vimentine citrullinée, ciblant les précurseurs d'ostéoclastes riches en vimentine, induisant ainsi l'ostéoclastogénèse et la perte osseuse (Harre *et al.*, 2012 ; Schett et Gravallesse, 2012).

3.4. Conséquences systémiques

L'AR est associée à un risque important de survenue de différentes pathologies. Le risque de survenue de maladies cardiovasculaires est important chez les patients arthritiques, à cause d'une activation importante de l'endothélium et une accumulation des plaques athéromateuses stimulées par les cytokines inflammatoires (TNF α et IL-6). L'inflammation dans l'AR affecte également le cerveau causant une réduction de la fonction cognitive, les poumons par le développement de maladies fibrotiques, le foie (phase aiguë de la réponse inflammatoire et anémie à long terme), ainsi que les muscles (sarcopénie) et l'os (ostéoporose), (McInnes *et al.*, 2011 ; Guo *et al.*, 2018 ; Smolen *et al.*, 2018).

4. Traitement de l'arthrite rhumatoïde

L'objectif principal du traitement de l'AR est de contrôler l'inflammation et la douleur et de limiter la destruction articulaire. Cinq classes principales de médicaments sont utilisés dans le traitement de l'AR (Kumar et Banik, 2013 ; Malekzadeh., 2017).

4.1. Analgésiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont capables de réduire la douleur mais n'ont aucun effet sur les dommages articulaires. Ils agissent principalement par inhibition de l'enzyme cyclooxygénase (COX-1 et 2), inhibant ainsi la formation des prostaglandines et des thromboxanes à partir de l'acide arachidonique (Kumar et Banik, 2013 ; Malekzadeh, 2017).

Le paracétamol est le principal analgésique utilisé en raison de ses faibles effets secondaires. Les AINS les plus récemment prescrits sont Celecoxib et Refecoxib, inhibiteurs sélectifs de l'enzyme COX-2, les rendant plus intéressants par rapport au diclofenac et l'indométacine les plus anciennement utilisés. Les principaux effets indésirables de ces molécules sont les troubles gastriques, l'élévation des enzymes hépatiques et le risque de troubles cardiovasculaires (Kumar et Banik, 2013 ; Malekzadeh, 2017).

4.2. Glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont un groupe d'hormones stéroïdiennes capables de se lier aux récepteurs du cortisol exerçant ainsi leurs actions anti-inflammatoire et immunosuppressive. Ils sont prescrits pour une courte période de traitement en raison de leurs nombreux effets secondaires, en particulier le gain de poids, l'hypertension artérielle, l'ostéoporose, l'ulcère gastro-intestinal et le risque d'infections (Kumar et Banik, 2013 ; Quan, 2013).

4.3. Anti-rhumatismaux modificateurs de la maladie

Les antirhumatismaux modificateurs de la maladie, « Disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) », ciblent l'inflammation et réduisent la progression des dommages articulaires. Ils sont classés en deux catégories ; les DMARDs synthétiques (conventionnels et ciblés) et biologiques (Aletaha et Smolen, 2018).

4.3.1. DMARDs synthétiques

4.3.1.1. DMARDs conventionnels

Les plus utilisés sont le Methotrexate (MTX), sulfasalazine (SSZ), et leflunomide. Leur utilisation à long terme nécessite un suivi régulier de certains paramètres biologiques (Wilsdon et Hill, 2017 ; Aletaha et Smolen, 2018). Le MTX est un antagoniste de l'acide folique, il agit par inhibition des enzymes impliquées dans la synthèse des purines (dihydrofolate réductase) aboutissant à une inhibition de l'activation de LT. Le SSZ est composé d'un agent anti-inflammatoire (acide 5-aminosalicylique) et antibactérien (sulfapyridine). Il est clivé dans le côlon par les enzymes bactériennes en acide acétylé salicylique et sulfapyridine. Celui-ci joue le rôle d'inhibiteur des facteurs de transcription impliqués dans l'inflammation (Aletaha et Smolen, 2018 ; Calvo Alén *et al.*, 2018).

Leflunomide est le plus récent des DMARDs, une pro-drogue dont le métabolite actif est issu de son métabolisme hépatique connu sous le nom de teriflunomide. C'est un agent immunomodulateur bloquant la prolifération des LT activés, par inhibition de la synthèse de l'ADN. Des effets secondaires sont également observés avec leflunomide en particulier gastro-intestinaux, dermatologiques, métaboliques et une hypertension artérielle (Wilsdon et Hill, 2017 ; Aletaha et Smolen, 2018).

4.3.1.2. DMARDs synthétiques ciblés

Ce sont de petites molécules chimiques inhibitrices des protéines kinases des cascades de signalisation inflammatoire. Tofacitinib est un inhibiteur des JAK, prescrit chez les patients atteints d'AR en phase modérée à active, qui n'ont pas répondu ou ont eu une réponse inappropriée au MTX. L'usage du tofacitinib augmente le risque d'infections (tuberculose) et de pathologies malignes (lymphome) (Wilsdon et Hill, 2017 ; Aletaha et Smolen, 2018).

4.3.2. DMARDs biologiques

Ce sont des thérapies ciblant des molécules biologiques impliquées dans la pathogenèse de l'AR.

4.3.2.1. Inhibiteurs de cytokines

Le TNF α et l'IL-6 sont abondamment retrouvées dans le sérum et le liquide synovial des patients atteints de l'AR. Ces deux cytokines jouent un rôle clé dans la pathogenèse de l'AR aboutissant à la destruction articulaire. A cet effet, des anticorps monoclonaux anti-TNF α ont été développés et utilisés en clinique (Infliximab, adalimumab et certolizumab). Le tocilizumab, molécule antagoniste du récepteur à l'IL-6 a été également utilisé. Cependant, le développement d'Acs contre ces Acs monoclonaux à long terme, diminue considérablement leur efficacité en plus d'autre effets indésirables tels que des douleurs abdominales, une élévation des enzymes hépatiques et des infections du tractus respiratoire (Conti *et al.*, 2013 ; Kumar et Banik, 2013 ; Burmester et Pop, 2017).

4.3.2.2. Thérapie anti-LB

Les LB jouent également un rôle important dans la pathogenèse de l'AR, ils sont ciblés grâce aux Acs monoclonaux anti-CD20 (Rituximab). Le Rituximab se fixant sur le CD20, initie la voie classique d'activation du complément et la mort des LB par ADCC. Ce traitement est le plus efficace dans le cas d'AR séropositive. Il est également efficace en combinaison avec le MTX chez les patients non répondeurs au traitement au MTX seul ou aux anti-TNF α seuls. Les mêmes effets secondaires que les autres traitements biologiques sont observés (Conti *et al.*, 2013 ; Burmester et Pop, 2017 ; Wilsdon et Hill, 2017).

4.4. Thérapie bloquant la co-stimulation des LT

L'Abatacept est un médicament immunosuppresseur sélectif composé d'une protéine de fusion CTLA-4/Ig. Elle joue le rôle antagoniste du CD28, molécule du second signal d'activation des LT, grâce à sa fixation aux molécules de co-stimulation CD80/86 sur les CPA, d'où un blocage de l'activation des LT. C'est une thérapie efficace en cas d'AR active ou chez les patients n'ayant pas répondu aux ARMM. Des céphalées, des nausées, des infections, et la formation d'Acs spécifiques sont observés lors de l'utilisation de cette thérapie (Conti *et al.*, 2013 ; Kumar et Banik, 2013 ; Wilsdon et Hill, 2017).

5. Thérapies complémentaires

L'AR est une pathologie chronique nécessitant un traitement à long terme conduisant à un nombre important d'effets secondaires. A cet effet, 30-60% des patients arthritiques utilisent des médicaments complémentaires et alternatifs (MCA) afin de réduire les symptômes liés à la pathologie et d'améliorer leur état général de santé (Fernández-Llanio *et al.*, 2016).

5.1. Suppléments alimentaires

5.1.1. Acides gras polyinsaturés

Les acides gras polyinsaturés, sont reconnus pour leur potentiel anti-inflammatoire et antioxydant. Les acides gras de type oméga-3 provenant essentiellement des huiles de poissons (acide eicosa-pentaenoïque (EPA) et acide decosahexaenoïque (DHA), et de type oméga-9 (acide ecosatrienoïque) issus de l'huile d'olive, ont été associés à une réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL-1 β), (Johnson et Bradford, 2014 ; Khorsan *et al.*, 2014). Ils sont également métabolisés en résolvines, molécules clé de la résolution de l'inflammation (Serhan *et al.*, 2014 ; Rajaei *et al.*, 2015).

Par ailleurs, il a été démontré qu'un supplément en acides gras oméga-3 et en huile d'olive chez des patients arthritiques, permet une amélioration précoce de la pathologie ainsi qu'une réduction de l'utilisation des AINS (Lee *et al.*, 2012 ; Gioxari *et al.*, 2018).

5.1.2. Vitamine D

Le rôle bénéfique de la vit D sur l'AR a été démontré en clinique et dans les modèles expérimentaux (Zhou *et al.*, 2019 ; Velikova *et al.*, 2017). La vitamine D est indispensable dans le maintien de l'homéostasie du métabolisme phosphocalcique. Elle joue également un rôle régulateur du système immunitaire, par inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires et des prostaglandines (Wen et Baker., 2011 ; Song *et al.*, 2012).

5.1.3. Probiotiques

Les probiotiques sont les bactéries bénéfiques pour la santé lorsque administrées à des quantités adéquates. Il a été démontré que les probiotiques joueraient un rôle thérapeutique dans les pathologies inflammatoires chroniques telle que l'AR (Yeoh *et al.*, 2013). L'administration de *Lactobacillus casei* a montré une diminution considérable de la production des cytokines pro-inflammatoires, une réduction de l'infiltration lymphocytaire et une amélioration du score des lésions histologiques (Amdekar *et al.*, 2011 ; Alipour *et al.*, 2014).

5.2. Plantes médicinales

Différentes plantes médicinales ont été étudiées dans la thérapie de l'AR (Choudhary *et al.*, 2015 ; Kapoor *et al.*, 2017, Venkatesha *et al.*, 2018). Il a été clairement démontré que le gingembre (*Zingiber officinale* Roscoe) est d'une importance cruciale dans la réduction de la douleur et de l'inflammation associées à l'AR.

Ses phyto-constituants (Diarylheptanoïde, Yakuchinone A, proanthocyanidine), semblent avoir un effet anti-inflammatoire *via* la réduction de la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes (Kaur *et al.*, 2012 ; Al-Nahain *et al.*, 2014a). L'aloë vera est également l'une des plantes médicinales les plus utilisées en thérapie anti-inflammatoire. Sa propriété anti-arthritique est particulièrement due à l'antraquinone, un alcaloïde dérivé de l'antracène (Al-Nahain *et al.*, 2014b ; Kadhim *et al.*, 2016).

Les extraits actifs de plantes seraient capables de contrôler l'évolution de l'AR *via* la régulation des voies moléculaires de l'inflammation (NFκB, MAPK et STAT3), aboutissant à l'inhibition de la production des médiateurs pro-inflammatoires et à l'induction des effecteurs anti-inflammatoires (Astry *et al.*, 2015 ; Venkatesha *et al.*, 2016). Cependant, des essais supplémentaires s'avèrent nécessaires afin de vérifier l'existence d'éventuelles interactions pouvant altérer l'efficacité de ces molécules bioactives ou engendrer des effets secondaires. De plus, la détermination du mécanisme d'action des extraits actifs issus des plantes médicinales reste une priorité importante pour valider leur utilisation en thérapie de l'AR (Dudics *et al.*, 2018 ; Venkatesha *et al.*, 2018).

6. Modèles expérimentaux de l'arthrite rhumatoïde

De nombreux modèles animaux de l'AR ont été développés dans le but d'évaluer le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules candidats pour un futur remède de l'AR. Ils permettent également de comprendre les mécanismes mis en jeu dans la pathogenèse et la progression de cette pathologie (Kollias *et al.*, 2011 ; Roy *et Ghosh*, 2013 ; Choudhary *et al.*, 2018).

6.1. Modèles induits

6.1.1. Arthrite induite à l'adjuvant complet de Freund (AIA)

C'est le premier modèle décrit par Pearson (1956). Ce modèle est induit chez le rat Wistar par injection de l'adjuvant complet de Freund (ACF), en intradermique à la base de la queue ou dans l'une des pattes postérieures (Roy et Ghosh, 2013 ; Choudhary *et al.*, 2018). C'est un modèle fiable caractérisé par une apparition rapide (10-14 jours) et une progression inflammatoire marquée par la résorption osseuse. Il permet la reproduction de la plupart des symptômes de l'AR observés chez l'homme. C'est un modèle neutrophiles et LT-dépendant largement utilisé pour tester de nouvelles molécules thérapeutiques (Choudhary *et al.*, 2018).

6.1.2. Arthrite induite au collagène type-II

Différents types de protéines dérivées du cartilage ont été utilisées pour induire l'arthrite chez le rat. Il s'agit notamment du collagène-II, type-XI et des protéines matricielles oligomériques du cartilage. Le collagène-II est le plus utilisé, injecté en émulsion dans de l'adjuvant incomplet de Freund en intradermique ou en sous-cutané, chez les rats Dark Agouti et Lewis (Bevaart *et al.*, 2010 ; Choudhary *et al.*, 2018). Ce modèle a été décrit pour la première fois chez le rat (Trentham *et al.*, 1977). L'arthrite expérimentale induite au collagène-II, apparaît 10-13 jours après immunisation avec un pic au 20^{ème} jour, puis décline graduellement pour réapparaître plus tard de façon chronique accompagnée de manifestations sévères. La rupture de la tolérance et la génération d'auto-anticorps envers le collagène-II sont les caractéristiques principales de ce modèle (Bendele, 2001 ; Kannan *et al.*, 2005 ; Arrar *et al.*, 2013 ; Mc Namee *et al.*, 2015).

Chez la souris, le modèle au C-II est réalisé chez des souches susceptibles (DBA/1, B10.Q et B10.RIII DBA/1). Ces souris développent une polyarthrite auto-immune caractérisée par une destruction du cartilage et une érosion sévère de l'os en plus de l'apparition d'un taux élevé d'AcS anti-CII. Les symptômes apparaissent plus tard après inoculation (21 à 25 jours) mais durent plus longtemps par rapport au modèle chez le rat (Kannan *et al.*, 2005 ; Bevaart *et al.*, 2010).

6.2. Modèles génétiques

D'autres modèles de l'AR sont développés spontanément chez des souris génétiquement modifiées, soit déficientes (knock-out) ou transgéniques pour un gène d'intérêt. Ces modèles sont particulièrement utiles pour étudier le rôle des gènes cibles dans la pathogenèse de l'AR (Kollias *et al.*, 2011 ; Choudhary *et al.*, 2018).

Monach *et al.* (2004) ont décrit qu'un croisement de souris KRN avec des souris NOD donne naissance à des souris spontanément arthritiques (K/BxN) après 4 à 5 semaines d'âge. La pathologie développée est sévère et l'inflammation articulaire est symétrique semblable à la pathologie humaine. Ce modèle dépend des molécules de CMH-II (I-Ag7) et des LB. L'AR chez les souris K/BxN est développée suite à une réponse immunitaire envers l'enzyme glucose-6-phosphate isomérase (G6PI) (Bevaart *et al.*, 2010). Les LT sont importants dans l'initiation de la pathologie dans ce modèle, ils reconnaissent un peptide dérivé de la G6PI présenté sur les molécules de CMH-II I-Ag7 activant ainsi les LB qui produisent des auto-anticorps spécifiques (Choudhary *et al.*, 2018).

III. Substances naturelles bioactives

CHAPITRE III. SUBSTANCES NATURELLES BIOACTIVES

Les substances naturelles bioactives ou métabolites secondaires, sont des molécules biologiques produites par des organismes vivants en réponse à des stimuli biotiques (pathogènes et herbivores) ou abiotiques liées aux conditions de l'environnement. Ces composés, assurent également certaines fonctions physiologiques, tels que le développement et la reproduction (Tiwari et Rana, 2015 ; Olivoto *et al.*, 2017). Les métabolites secondaires sont de petites molécules dérivés du métabolisme primaire. Ils forment une grande famille de composés de structures chimique très diversifiées, dont la majorité est dotée d'activités bénéfiques pour la santé de l'Homme (Taiz et Zeiger, 2010 ; Ncube *et al.*, 2012; Wink, 2015), (Figure 7).

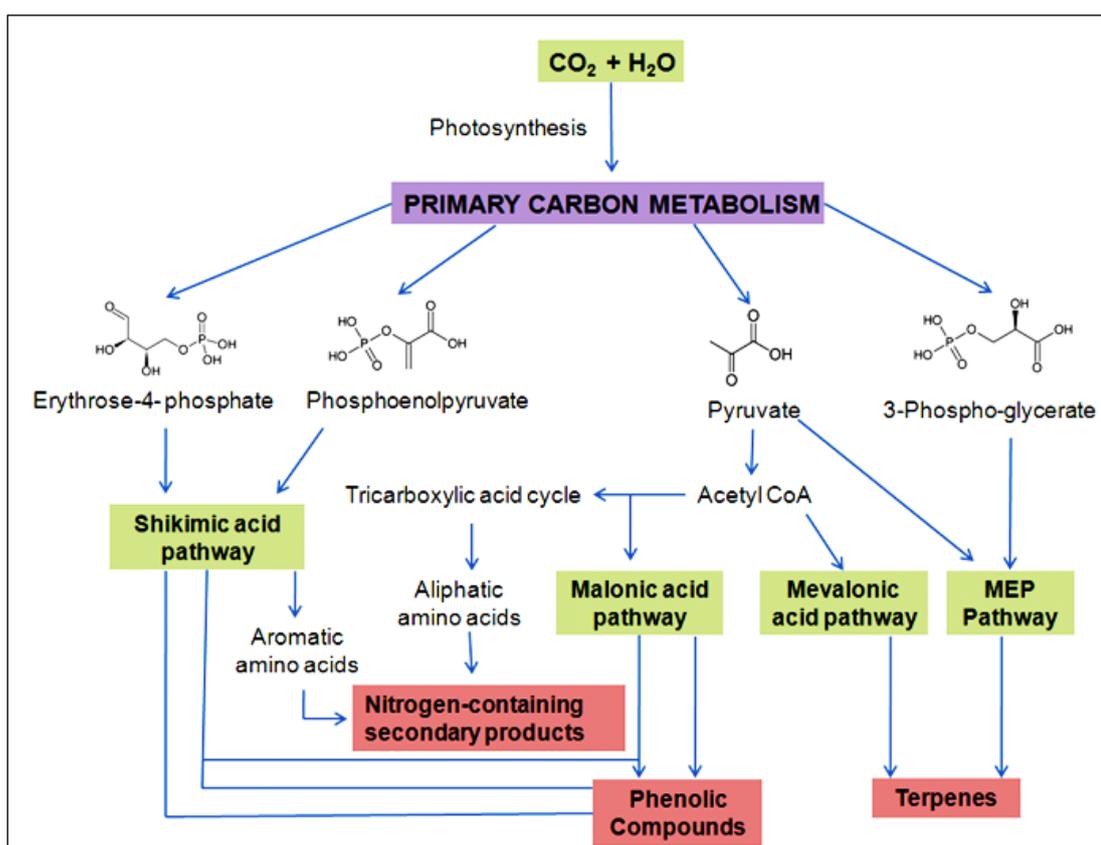


Figure 7. Différentes classes des métabolites secondaires (Taiz et Zeiger, 2010).

Plus de 200.000 molécules bioactives sont connues, d'autres sont de plus en plus découvertes, constituant ainsi une source biogénique importante à explorer dans le développement pharmaceutique. Les métabolites secondaires sont classés, selon leurs structures chimiques, en trois groupes principaux ; les terpènes, les alcaloïdes et les polyphénols (Wink, 2015 ; Olivoto *et al.*, 2017).

1. Terpènes

Les terpènes (terpenoïdes ou isoprénoïdes) constituent le plus grand groupe des métabolites secondaires (~50.000 substances identifiées). Leur nom provient de la terpentine, cire de pin. Ce sont des hydrocarbures $(C_5H_8)_n$ retrouvés principalement chez les plantes, mais aussi chez les insectes, les bactéries, les champignons et les algues. Ils sont contenus dans les huiles essentielles, les résines, les cires et latex (Yadava *et al.*, 2014 ; Tholl, 2015 ; Yazaki *et al.*, 2017).

Les terpènes sont formés d'une ou de plusieurs unités structurales de base à cinq carbones, l'isoprène $(CH_2-C(CH_3)-CH-CH_2)$. Ils sont responsables des différentes arômes et senteurs des plantes (Tholl, 2015 ; Singh et Sharma, 2015 ; Yazaki *et al.*, 2017). Par ailleurs, les terpènes sont largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire et cosmétique. Ils sont particulièrement reconnus pour leurs actions anticancéreuse et antiparasitaire (Ncube et Van Staden, 2015 ; Singh et Sharma, 2015 ; Sülsen *et al.*, 2017).

Les terpènes sont classés selon le nombre des unités isoprène les constituant. L'association de plusieurs unités isopréniques aboutit à la formation des monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tetraterpènes (C40) et polyterpènes (> C40), (**Figure 8**), (Singh et Sharma, 2015 ; Ludwiczuk *et al.*, 2017 ; Sülsen *et al.*, 2017).

1.1. Monoterpènes

Les monoterpènes sont composés de deux unités isoprène, retrouvés souvent sous forme d'huiles volatiles dans les plantes aromatiques productrices d'huiles essentielles (Lamiaceae, Apiaceae, Pinaceae...etc.). Les plus connus des monoterpènes sont les menthols et les iridoïdes reconnus pour leurs activités antibactérienne, antifongique et anticancéreuse (Sobral *et al.*, 2014 ; Guimarães *et al.*, 2019).

1.2. Sesquiterpènes et sesquiterpènes lactones

Les sesquiterpènes sont composés de trois unités isoprène, par cyclisation d'un précurseur en C15. C'est la classe la plus diversifiée des terpènes, retrouvés largement chez les Asteraceae sous forme volatile (Wink, 2012 ; Perveen, 2018). Les sesquiterpènes sont reconnus particulièrement pour leurs actions anti-protozoaire et anti-tumorale. L'Artémisinine est l'un des plus connus, issu de l'armoise annuelle (*Artemisiaannua*), développée en une drogue potentielle (Artesunate) contre *Plasmodium falciparum* (Wink, 2015 ; Sülsen *et al.*, 2017).

1.3. Sesterpènes

Les sesterpènes sont formés de cinq unités d'isoprène. Ils sont retrouvés chez les champignons, les insectes et les organismes marins. Ils sont dotés de propriétés pharmacologiques anti-cancéreuse, anti-inflammatoire, antimicrobienne et antifongique (Ludwiczuk *et al.*, 2017 ; Sülsen *et al.*, 2017).

1.4. Diterpènes

Les diterpènes sont constitués de quatre unités isoprène, retrouvés chez les Euphorbaceae, les Lamiaceae et les Taxaceae. Ils sont dotés de différentes activités pharmacologiques

notamment, cardioprotectrice (tanshinone), anticancéreuse (taxol) et antioxydante (carnosol) (Wink, 2015 ; Sülsen *et al.*, 2017).

1.5. Triterpènes

Les triterpènes sont composés de six unités isoprène (C30), dérivés du squalène par cyclisation. Ils possèdent plusieurs groupes méthyl pouvant être oxydés en alcools, en aldehydes, et en acides carboxyliques, ce qui les rend plus complexes et à large spectre d'activités biologique. Les triterpènes sont reconnus pour leurs activités anti-tumorale, anti-inflammatoire et anti-thrombose (Sülsen *et al.*, 2017, Perveen, 2018).

1.6. Tetraterpènes (Caroténoïdes)

Les caroténoïdes sont formés de huit unités isoprène (C40). Ce sont des pigments naturels liposolubles, dont les carotènes et les xanthophylles, particulièrement reconnus pour leur action anti-oxydante. Le β -carotène, précurseur de la vitamine A, est le pigment photosynthétique majeur (Fiedor et Burba, 2014 ; Young et Lowe, 2018).

1.7. Polyterpènes

Les polyterpènes sont des hydrocarbures polymères d'isoprénoïdes, comprenant plus de 8 unités isoprène. La gomme naturelle est l'exemple-type des polyterpènes contenant plusieurs unités cis-isoprène (Tholl, 2015 ; Ludwiczuk *et al.*, 2017).

2. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés organiques de faible poids moléculaire, synthétisés souvent à partir d'acides aminés et contenant au moins un atome d'azote dans leur structure hétérocyclique. Ils représentent une classe hautement diversifiée des métabolites secondaires (~12.000 molécules) produits par une variété de végétaux supérieurs (Apocynaceae, Asteraceae, Solanaceae...etc.), (Qiu *et al.*, 2014 ; Ncube et Van Staden, 2015 ; Wink, 2015).

Les alcaloïdes possèdent des activités biologiques importantes leur permettant d'interférer avec les neurotransmetteurs, le transport membranaire actif et la synthèse protéique. Ils sont à cet effet utilisés en thérapie comme tranquillisant, antalgiques, relaxant musculaire et anticancéreux (Kaur et Arora, 2015 ; Ncube et Van Staden, 2015 ; Wink, 2015). Les alcaloïdes sont classés selon leur structure, ou leur précurseur biogénique commun ou par famille des plantes les produisant (**Figure 9**), (Qiu *et al.*, 2014 ; Kaur et Arora, 2015 ; Roy, 2017).

2.1. Dérivés de la L-ornithine

La L-ornithine et/ou la L-arginine sont les premiers précurseurs des alcaloïdes tropaniques. La putrécine, produit de décarboxylation de la L-ornithine et/ou d'arginine, est le précurseur de ces alcaloïdes (Sweta et Lakshmi, 2015 ; Kohnen-Johannsen et Kayser, 2019).

Les alcaloïdes tropaniques sont principalement retrouvés chez les Solanaceae, leur structure consiste en deux anneaux pyrrolidine et pipéridine. Ils possèdent une activité anticholinérgique d'où leur utilisation comme médicaments analgésiques, anticolique et spasmolytique (Sweta et Lakshmi, 2015 ; Kohnen-Johannsen et Kayser, 2019). Les alcaloïdes pyrrolizidines et pyrrolidines sont d'autres alcaloïdes dérivés de la L-ornithine. Ils sont

également dotés de diverses propriétés pharmacologiques, antidiabétique, antifongique et antituberculeuse (Kaur et Arora, 2015 ; Schramm *et al.*, 2019).

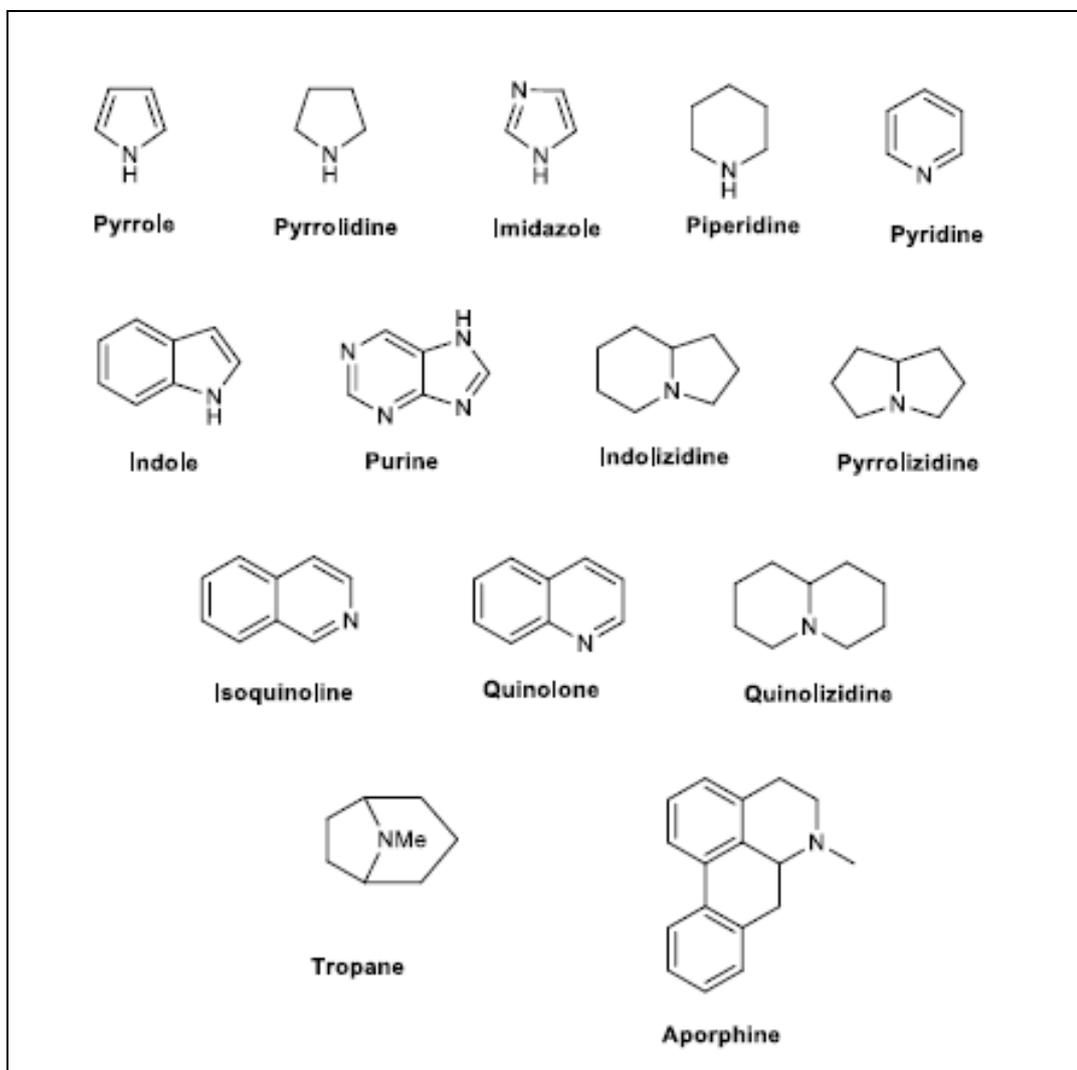


Figure 9. Structure des principaux noyaux chimiques des alcaloïdes (Casciaro *et al.*, 2020).

2.2. Dérivés de la L-lysine

L'acide aminé L-lysine est le précurseur des alcaloïdes pipéridine et quinolizidine. La première étape de leur biosynthèse est la décarboxylation de la L-lysine en cadavérine (Kaur et Arora, 2015 ; Wink, 2015 ; Bunsupa *et al.*, 2017).

Les alcaloïdes pipéridine sont largement retrouvés dans différentes espèces végétales et sont dotés de différentes activités pharmacologiques ; bactéricides, insecticide et fongicide (Roy, 2017). Par ailleurs, les alcaloïdes quinolizidines constituent une source importante de médicaments, grâce à leur nombreuses propriétés pharmacologiques ; cytotoxiques, antipyrétique, antibactérienne, antivirale et hypoglycémiant (Bunsupa *et al.*, 2017 ; Roy, 2017).

2.3. Dérivés de la L-tyrosine ou de la L-phenylalanine

Les alcaloïdes isoquinoléiques sont dérivés de la L-tyrosine et de la L-phenylalanine. Ils sont formés à partir du précurseur 3,4-dihydroxytyramine (dopamine) suite à une réaction avec un aldéhyde ou une cétone. Ces composés sont produits presque exclusivement par la famille des Amaryllidaceae (Facchini, 2001 ; Ziegler et Facchini, 2008). Les alcaloïdes isoquinoléiques sont largement utilisés en pharmacologie pour leur potentiel inhibiteur de l'enzyme cholinestérase, et leurs activités anti-inflammatoire et anticancéreuse (Kaur et Arora, 2015 ; Ncube et Van Staden, 2015 ; wink, 2015).

2.4. Dérivés de la L-tryptophane

La tryptamine (5-hydroxytryptamine : 5-HT) ou sérotonine, est le produit de décarboxylation de la L- tryptophane, d'où dérive la grande classe des alcaloïdes indoliques (Ncube et Van Staden, 2015). Les alcaloïdes indoliques sont particulièrement reconnus pour leur effet antidépresseur, utilisés en thérapie anticancéreuse et comme tranquillisants (Qiu *et al.*, 2014 ; Hamid *et al.*, 2017).

Par ailleurs, les alcaloïdes β -carboline forment un autre groupe des alcaloïdes indoliques, et sont abondamment retrouvés chez les organismes invertébrés marins (spongiaires). Ils sont reconnus pour leur propriétés anti-tumorales, antiparasitaires et antivirales en plus de leur

effet psychostimulant (Cao *et al.*, 2007 ; Ziegler et Facchini, 2008). Les alcaloïdes de l'ergot, font aussi partie des alcaloïdes indoliques. Ils sont produits par les champignons (*Claviceps purpurea*) parasitant les plantes monocotylédones (seigle, blé et orge). Ce sont des agonistes des récepteurs dopamine d'où leur utilisation comme tranquillisants et analgésiques (Hulvova *et al.*, 2013 ; Wink, 2015).

2.5. Dérivés de l'acide anthranilique

Les alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique sont retrouvés en abondance chez les Rutaceae. Ils sont également produits par les champignons (*Penicillium*) et les bactéries (*Pseudomonas*). La condensation de l'acide anthranilique avec l'acétate ou le malonate est la première étape de biosynthèse de ces alcaloïdes par formation d'un noyau quinoléine. Ils sont notamment connus pour leur activité anti-tumorale (da Silva *et al.*, 2013 ; Wink, 2015 ; Shang *et al.*, 2018).

2.6. Alcaloïdes purines

Les alcaloïdes purines sont dérivés des bases purines connus sous le nom de xanthènes, dérivés elles-mêmes des xanthines. Leur biosynthèse est basée sur des réactions de méthylation de la xanthosine, suivie d'une étape d'hydrolyse de la xanthosine méthylée (Ziegler et Facchini, 2008 ; Kaur et Arora, 2015 ; Ncube et Van Staden, 2015). La caféine (1,3,7-triméthylxanthine), la théobromine (3,7-diméthylxanthine) et la théophylline (1,3-diméthylxanthine) sont les plus connus des alcaloïdes purines. Ils ont des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires en plus de leurs effets hypoglycémiant et hypolipémiant (Herman et Herman, 2013 ; Li *et al.*, 2013 ; Kaur et Arora, 2015).

3. Polyphénols

Les polyphénols sont des composés organiques aromatiques (phénols) caractérisés par la présence de différents groupes hydroxyles. Ce sont des métabolites secondaires produits par les plantes pour lutter contre les agressions climatiques, les pathogènes et les herbivores. Ils jouent également un rôle important dans la reproduction comme attractants de pollinisateurs et dispersants de graines, et procurent à plusieurs aliments leurs différentes propriétés organoleptiques (Tsao, 2010 ; Abbas *et al.*, 2017 ; Cory *et al.*, 2018).

Leur structure chimique portant des groupes fonctionnels à la propriété particulière de piéger les radicaux libres et de chélation des métaux, leur donne la propriété d'antioxydants naturels (Bravo, 1998 ; Tsao, 2010 ; Abbas *et al.*, 2017). Les polyphénols possèdent ainsi des effets préventifs et/ou thérapeutiques envers les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, cancéreuses et les pathologies inflammatoires chroniques (Maru *et al.*, 2014 ; Hussain *et al.*, 2016 ; Cory *et al.*, 2018 ; Fraga *et al.*, 2019).

Les polyphénols sont classés selon le nombre des anneaux phénols les constituant et les éléments structuraux reliant ces anneaux, en quatre classes principales ; les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes, et les lignanes (**Figure 10**), (Tsao, 2010 ; Maru *et al.*, 2014 ; Abbas *et al.*, 2017).

3.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des polyphénols non-flavonoïdes, classés en deux types principaux ; dérivés de l'acide benzoïque et dérivés de l'acide cinnamique de structure C1-C6 et C3-C6 respectivement (**Figure 10**), (Tsao, 2010 ; Maru *et al.*, 2014 ; Abbas *et al.*, 2017).

L'acide benzoïque est très rarement rencontré dans les plantes comestibles, contrairement à l'acide hydroxycinnamique et ses dérivés qui sont très répandus, notamment dans les fruits.

Les acides p-coumarique, caféique, férulique, chlorogénique et sinapique sont les plus répandus des acides phénoliques, leur concentration devient plus importante à maturité des fruits (Manach *et al.*, 2004 ; Maru *et al.*, 2014 ; Abbas *et al.*, 2017).

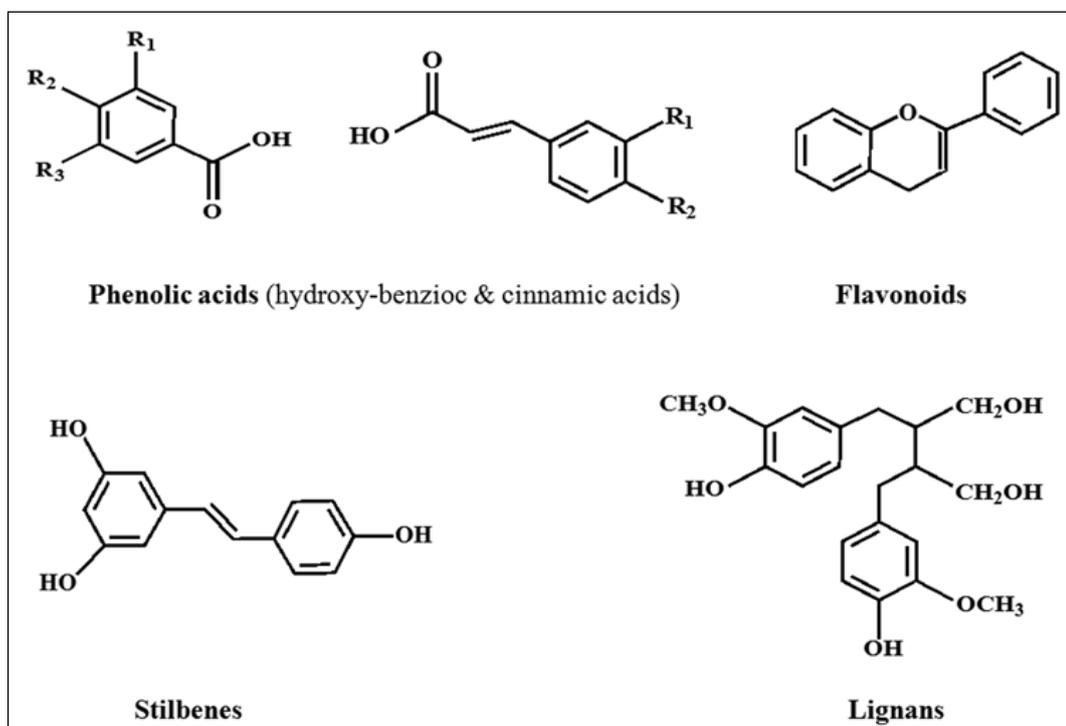


Figure 10. Principales classes des polyphénols (Pandey et Rizvi, 2009).

3.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés aromatiques dont la structure de base est un noyau flavan (2-phenylchroman) formé de trois anneaux A (en C6), C (en C3) et B en (C6). Ils sont dérivés de la condensation de l'acide cinnamique avec 3 groupes malonyl-CoA. Les flavonoïdes sont souvent liés à un ou plusieurs conjugués sucres. Ils sont responsables de la pigmentation des fleurs, des fruits et des feuilles (Maru *et al.*, 2014 ; Panche *et al.*, 2016).

Les flavonoïdes sont classés selon les variations structurales de l'anneau C (présence de doubles liaisons, groupes hydroxyle et/ou 4-oxo) et le nombre et la position de groupements hydroxyles et méthyles sur les anneaux A et B. Différentes classes de flavonoïdes sont ainsi distinguées ; les flavones, les flavanols, les isoflavones, les flavonols et les anthocyanidines (**Figure 11**), (Bravo, 1998 ; Manach *et al.*, 2004).

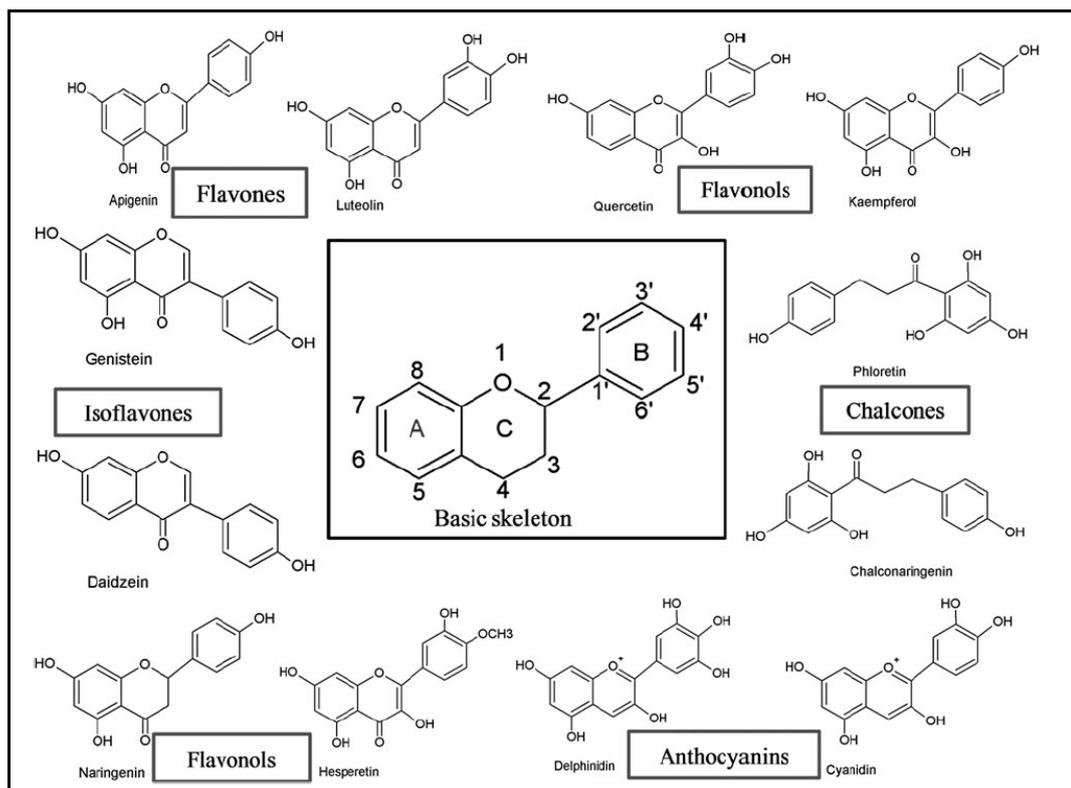


Figure 11. Classification chimique des flavonoïdes (Panche *et al.*, 2016).

3.2.1. Flavones et dérivés

Les flavonols, dérivés 3-hydroxy des flavones, constituent le plus grand groupe des flavonoïdes. Ils contiennent une double liaison entre C2 et C3 et un groupement hydroxyle en C3. Les plus connus des flavonols aglycones, sont la quercétine et le kaempférol (Tsao, 2010 ; Cutrim et Cortez, 2018). Les flavones sont beaucoup moins répandus, ils contiennent

également une double liaison entre C3 et C2, et les plus connus sont la lutéoline et l'apigénine (Monach *et al.*, 2004 ; Tsao, 2010).

Les flavanones quant à eux sont des dérivés 2,3-dihydrogénés des flavones. Ils contiennent une molécule d'oxygène en C4 et sont caractérisés par un anneau saturé de 3C (Panche *et al.*, 2016; Abbas *et al.*, 2017). Ils sont retrouvés dans les plantes aromatiques, notamment dans les agrumes ; dans le citron (ériodictyol) et les oranges (hespéridine) (Monach *et al.*, 2004 ; Tsao, 2010). Les flavanonols sont des dérivés 3-hydroxy des flavanones, la taxifoline est l'une des plus connue (Panche *et al.*, 2016).

3.2.2. Flavanols

Les flavanols (flavan-3-ols/flavans ou proanthocyanidines) sont parmi les polyphénols alimentaires les plus abondants et les plus actifs. Ils sont communément appelés cathéchines (Monach *et al.*, 2004 ; Tsao, 2010). Les flavanols sont majoritairement retrouvés dans les fruits, sous forme monomérique telles que la catéchine et l'épicatéchine, ou oligomériques telles que les pro-anthocyanidines ou encore sous forme polymérique tels que les tanins condensés (Manach *et al.*, 2004 ; Tsao, 2010).

3.2.3. Isoflavones

Les isoflavones (néoflavonoïdes et chalcones) nommés également phyto-estrogènes du fait de leur similitude structurale et leur capacité de se lier aux récepteurs aux estrogènes. Ils sont semblables aux estrogènes, par la présence d'un groupe hydroxyle entre C4 et C7 ressemblant à l'estradiol et caractérisés par l'attachement de l'anneau B à l'anneau C en C3 et pas en C2 (Abbas *et al.*, 2017). Les isoflavones sont majoritairement retrouvés chez les légumineuses notamment dans le soja (génistéine et daidzéine), et possèdent un impact important sur la santé humaine (Rice-Evans, 2004).

3.2.4. Anthocyanines

Les anthocyanines sont des pigments naturels donnant leurs couleurs aux fleurs, aux fruits et aux légumes. Les anthocyanidines sont sous forme glycosylée en C3, en C5 ou en C7 de l'anneau A, chez la plupart des plantes (Manach *et al.*, 2004 ; Tsao, 2010 ; Abbas *et al.*, 2017). Ils ont la propriété de former des cations flavylum dans l'eau. Leur couleur dépend du pH du milieu, du degré d'hydroxylation et de méthylation des anneaux aromatiques, ainsi que du type des sucres de glycosylation (Heim *et al.*, 2002 ; Tsao, 2010 ; Fernandes *et al.*, 2014). Plus de 500 molécules d'anthocyanines sont distinguées selon l'état d'hydroxylation ou de méthylation de l'anneau B, et les différentes unités sucres de leur glycosylation. La cyanidine, la delphinidine et la prélargolidine sont les plus répandues des anthocyanidines (Heim *et al.*, 2002 ; Fernandes *et al.*, 2014).

3.3. Autres polyphénols

Les autres types de polyphénols non-flavonoïdes sont les stillbènes et les lignanes. Les stillbènes sont formés de deux composés phenyl reliés par un pont méthylène en C2. Leur distribution est limitée dans la nature, sous forme libre ou glycosylée, ils sont dimériques, trimériques ou polymériques. Le resvératrol (trans-3,4,5-trihydroxystillbène) est le plus important des stillbènes, retrouvé largement dans les raisins (Pandey et Rizvi, 2009 ; Tsao, 2010 ; Maru *et al.*, 2014). Par ailleurs, les lignanes sont des composés phénoliques contenant une structure 2,3-dibenzylbutane, formée par la dimérisation de deux résidus d'acide cinnamique. Elles jouent un rôle structural et sont retrouvées sous forme liée dans différentes graines notamment les graines de lin. Le sécoisolaricirésinol est le plus connu des lignanes, il joue le rôle de phyto-estrogènes (Pandey et Rizvi, 2009 ; Tsao, 2010 ; Maru *et al.*, 2014).

IV. *Hertia cheirifolia*

CHAPITRE IV. *HERTIA CHEIRIFOLIA*

1. Description et classification botanique

Hertia cheirifolia L. est une plante vivace au feuillage épais et persistant, d'un vert cendré. Ses feuilles sont simples et alternes de forme oblancéolée et petiolée sur des tiges lignifiées semi-rampantes. *Hertia cheirifolia* forme des sous-arbrisseaux bas et compacts de 30 à 40 cm de hauteur et de 50 cm de largeur et porte des marguerites d'un jaune vif (mars/juillet ou janvier/avril), (Quezel et Santa, 1963 ; Pottier-Alapetite, 1981), (**Figure 12**).

Hertia cheirifolia appelée couramment queue de castor ou othonne à feuilles de giroflée, est connue sous le nom de « Kerchoun » en arabe et « barbary ragwort » en anglais (Pottier-Alapetite, 1981 ; Beniston et Beniston, 1984). Elle est également appelée *Othonna cheirifolia* ou *Othonnopsis cheirifolia* (Massiot *et al.*, 1990). Le genre *Hertia* appartenant à la famille des Asteraceae est un genre de plantes médicinales endémiques du bassin méditerranéen, retrouvée particulièrement en Algérie orientale et en Tunisie centrale (Massiot *et al.*, 1990 ; Ammar *et al.*, 2009). C'est un genre qui comprend environ 12 espèces distribuées dans le nord et le sud de l'Afrique et le sud-ouest de l'Asie. La flore algérienne consiste en l'unique espèce *Hertia cheirifolia* L. répandue dans le nord-est de l'Algérie (Massiot *et al.*, 1990).

La classification botanique de *Hertia cheirifolia* L. est comme suit :

Règne : Plantae.

Sous-règne : Tracheobionta.

Embranchement : Magnoliophyta.

Super-division : Spermatophyta.

Classe : Magnoliopsida.

Sous-classe : Asteridae.

Ordre : Asterales.

Famille : Asteraceae.

Genre : *Hertia*.

Espèce : *Hertia cheirifolia* L. (Quezel et Santa, 1963).



Figure 12. Photographies de *Hertia cheirifolia* L. (Kasr El Abtal, Sétif).

2. Usages traditionnels et activités biologiques

Hertia cheirifolia L. est une plante médicinale aromatique connue pour ses effets anti-inflammatoires et antispasmodiques. Elle est utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés thérapeutiques dans les troubles digestifs et la cicatrisation des blessures (Zellagui *et al.*, 2012; Chermat et Gharzouli, 2015). Ces propriétés ont été étudiées et démontrées pour la première fois par Ammar *et al.* (2009). *H. cheirifolia* est également connue pour ses effets anti-nociceptif et hypoglycémiant. En effet, des infusions des feuilles de cette plante sont consommées comme remède hypoglycémiant, tandis qu'un broyat des feuilles est utilisé en cataplasme contre les douleurs articulaires et l'irritation cutanée (Bouriche *et al.*, 2016; Majouli *et al.*, 2018b).

Par ailleurs, différentes activités biologiques ont été attribuées aux huiles essentielles extraites à partir de la partie aérienne de *H. cheirifolia*. Il s'agit particulièrement de l'activité antibactérienne et antioxydante (Majouli *et al.*, 2016a; Majouli *et al.*, 2016b ; Segueni *et al.*, 2017). De plus, une activité acaricide des huiles essentielles de *H. cheirifolia* a été signalée par Attia *et al.* (2012 ; 2015).

Des travaux récents ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles de *H. cheirifolia* ainsi que différentes fractions organiques sont dotés d'un potentiel antibactérien, antioxydant et anti-inflammatoire (Bousselsela *et al.*, 2012, Bouriche *et al.*, 2016; Kada *et al.*, 2016; Majouli *et al.*, 2017a). Des activités antibactériennes, antioxydantes, anti- α glucosidase et gastroprotective ont été également attribuées aux extraits organiques préparés à partir des tiges, des fleurs et des racines de *H. cheirifolia* (Majouli *et al.*, 2017b ; Majouli *et al.*, 2017c ; Majouli *et al.*, 2018a). Enfin, l'extrait aqueux de la partie aérienne de *H. cheirifolia* pourrait constituer une bonne alternative aux pesticides conventionnels, grâce à leur effet anti-moustique notamment au stade larvaire (Amira *et al.*, 2018).

3. Composition chimique

Les premières investigations de la composition chimique d'extraits de *H. cheirifolia* datent des années 1990. Elles ont permis l'isolement et l'identification de composés sesquiterpéniques, dont des eremophilénolides et des lactones obtenus à partir de la fraction chloroformique de l'extrait méthanolique des feuilles (Massiot *et al.*, 1990 ; Aclinou *et al.*, 1991, Aclinou *et al.*, 1993). Dans la même fraction de l'extrait de feuilles de *H. cheirifolia*, Ammar *et al.* (2009) ont isolé et identifié de nouveaux composés. Il s'agit d'un sesquiterpène bakkenolide et de deux stéroïdes.

L'analyse par GC/MS des huiles essentielles extraites de la partie aérienne de *H. cheirifolia*, a révélé la présence d'un nombre important de composés terpéniques constituants de l'huile essentielle totale (Zellagui *et al.*, 2012 ; Majouli *et al.*, 2016a ; Segueni *et al.*, 2017).

Par ailleurs, l'analyse phytochimique de l'extrait méthanolique des feuilles de *H. cheirifolia* par HPLC a montré la présence d'un bon nombre de polyphénols, représentés particulièrement par les acides phénoliques et les flavonoïdes (Bouriche *et al.*, 2016). De même, l'analyse des extraits de tiges, de fleurs et de racines par RP-HPLC-UV a également révélé la présence d'un nombre important de polyphénols dont les acides phénoliques et les flavonoïdes (Majouli *et al.*, 2017a ; 2017b ; 2018a). Les résultats obtenus ont montré que l'acide cinnamique et la rutine seraient parmi les constituants majeurs des extraits de *H. cheirifolia* (Bouriche *et al.*, 2016 ; Majouli *et al.*, 2018b). Cette composition riche et diversifiée des extraits de *H. cheirifolia* est probablement à l'origine de la diversité de ses activités biologiques. De plus, aucun effet toxique aigu n'a été montré suite à l'administration de l'extrait de *H. cheirifolia* (2000 mg/Kg) (Bouriche *et al.* 2016).

Deuxième partie :

Etude expérimentale

I. Matériel et méthodes

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

La plante *Hertia cheirifolia* étudiée dans ce travail a été récoltée au stade de floraison au mois d'avril 2014 dans la région d'Ouled M'halla (Kasr El Abtal, Sétif). Elle a été identifiée par Pr. Laouer Hocine, professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie, université Sétif 1. Les différentes parties de la plante (feuilles, tiges, fleurs et racines) ont été séparées, nettoyées puis séchées à l'ombre pendant au moins 2 semaines. Chaque partie séchée a été ensuite broyée en poudre fine et gardée dans des récipients opaque hermétiquement fermés jusqu'au moment de l'extraction.

1.2. Animaux

Des souris Swiss albino mâles et femelles (22-25 g) ont été utilisées pour tester *in vivo* l'activité anti-inflammatoire aiguë des extraits de *H. cheirifolia*. Des rats Wistar femelles (150-180 g), ont été également utilisés pour l'étude de l'activité anti-inflammatoire des extraits de la plante dans le modèle de l'œdème de la patte induit à la carragénine et dans le modèle de l'arthrite induite par l'adjuvant complet de Freund. Les animaux en provenance de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), ont été acclimatés pendant une semaine. Ils étaient abrités dans des conditions normales avec accès libre à la nourriture et à l'eau. Ils ont été répartis, selon l'étude réalisée, en groupes parmi lesquels un groupe témoin positif et un autre négatif (n = 6). La manipulation des animaux a été réalisée selon la réglementation éthique internationale en vigueur (Déclaration d'Helsinki, 2013).

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits

L'extraction méthanolique a été effectuée par macération de la poudre obtenue de chaque partie dans du méthanol pur avec un ratio de 10% (m/v), pendant 3 semaines (Suleiman et al, 2010). A la fin de chaque semaine, le macérât obtenu est filtré sur du papier Whatman n° 3 et le résidu de la poudre est remis dans du méthanol pour une deuxième puis une troisième macération. Le filtrat obtenu est évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C. Enfin, le résidu de l'évaporation est mis à sécher dans l'étuve à 40°C. Chaque extrait brut ainsi obtenu est conservé dans des récipients hermétiques et gardé à l'abri de la lumière jusqu'au moment de son utilisation (**Figure 13**).

Par ailleurs, l'extrait délipidé est préparé à partir de l'extrait brut, grâce à une ampoule à décanter, par lavages successifs dans du n-hexane (v/v). Cette opération permet de séparer la fraction apolaire constituant la partie grasse de l'extrait. Le solvant de chacune des deux phases obtenues, est ensuite évaporé à 40°C par évaporation rotative (**Figure 13**), (Guemmaz *et al.*, 2018).

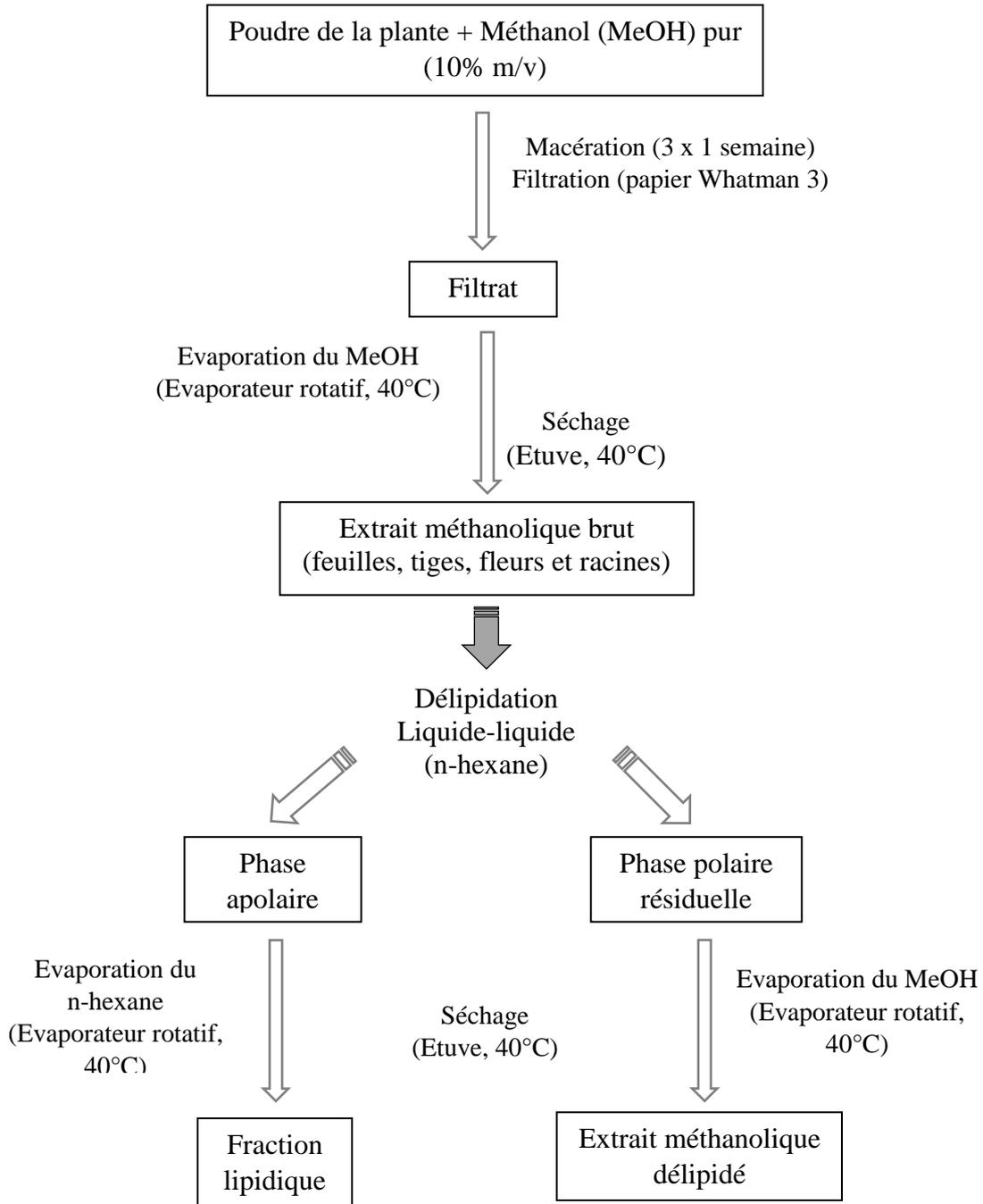


Figure 13. Procédure d'extraction et de délipidation à partir des différentes parties de *Hertia cheirifolia* L.

2.2. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes

2.2.1. Dosage des polyphénols

Le contenu en polyphénols totaux de l'extrait de chaque partie de la plante a été déterminé par la méthode au Folin-Ciocalteu (Aouachria *et al.*, 2017). 0.5 mL du réactif Folin-Ciocalteu (1:10) est ajouté à 0.1 mL de chaque extrait. Après 4 minutes, 0.4 mL d'une solution de carbonates de sodium (7.5%) ont été ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont agités au vortex puis incubés à l'obscurité pendant 1.5-2h à température ambiante. À la fin de cette incubation, l'absorbance est lue au spectrophotomètre ($\lambda=760$ nm). En parallèle, une série de concentrations croissantes (0-180 $\mu\text{g/mL}$) en acide gallique a été préparée pour réaliser la courbe standard. Celle-ci nous a permis d'exprimer le contenu en polyphénols de chaque extrait en mg équivalent d'acide gallique par gramme d'extraits (mg EqAG/g extrait).

2.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes a été évalué par la méthode au chlorure d'aluminium (AlCl_3) selon la méthode décrite par Aouachria *et al.* (2017). Dans chaque tube, 0,5 mL de l' AlCl_3 (2% dans de l'eau distillée) sont ajoutés à un volume égal de chaque extrait. Le mélange est agité au vortex puis incubé pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance de chaque échantillon est ensuite mesurée ($\lambda = 430$ nm). Afin d'estimer le contenu en flavonoïdes, une gamme étalon a été préparée de différentes concentrations (0 - 40 $\mu\text{g/mL}$) de la quercétine, un flavonoïde standard. Le contenu en flavonoïdes est donc quantifié en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EqQ/g d'extrait).

2.3. Analyse par HPLC avec détecteur à barrettes de diode (HPLC-DAD)

L'analyse des composés phénoliques contenus dans les extraits méthanoliques de *H. cheirifolia* est réalisée par HPLC-DAD utilisant un système Shimadzu HPLC composé de deux pompes LC-10AD, un détecteur à barrettes de diode et une colonne Luna C18 (4.6 x 250 mm, 5 µm). Chaque échantillon a été d'abord filtré sur un filtre (0.45 µm, Millipore), puis 20 µL de chaque extrait est dissout dans du méthanol (80%) puis injecté à une concentration de 10 mg/mL. Le flux d'élution est de 1 mL/min selon un gradient d'élution de 5-40% d'acétonitrile dans de l'eau désionisée (phase mobile) à pH = 2.5 (ajusté avec de l'acide trifluoro-acétique) pendant plus de 50 min. Afin d'analyser les flavonoïdes et les polyphénols, l'analyse par chromatographie à phase inversée est suivie à 350 et à 320 nm respectivement (Amarowicz *et al.*, 2008).

2.4. Etude de l'activité antioxydante

2.4.1. Effet scavenger du radical libre 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH')

Le test de piégeage du radical libre DPPH' par les différents extraits (bruts/délipidés) de la plante a été réalisé suivant la méthode décrite par Mokhnache *et al.* (2019). Un volume de 0.5 mL de différentes concentrations (0-1 mg/mL) de chaque échantillon a été mélangé à 1 mL de la solution de DPPH' préparée dans du méthanol (0.1 mM). L'ensemble des échantillons est ensuite incubé à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance de chaque tube est lue à $\lambda = 517$ nm, où le méthanol est utilisé comme blanc. L'acide ascorbique, l'acide gallique et la quercétine sont utilisés comme contrôles positifs.

L'activité scavenger du radical libre DPPH' exprimée en pourcentage est calculée selon la formule suivante : activité antioxydante (%) = $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$, où A_0 est l'absorbance du blanc et A_t est l'absorbance du test (extrait ou standard). Les résultats sont également

exprimés en terme de concentration neutralisant 50% (IC₅₀) du radical libre DPPH[•] et en Capacité Anti-oxydante Trolox Equivalent (TEAC) (mmol TEq./g extrait ± SD).

2.4.2. Effet scavenger du radical ABTS^{•+}

Cet essai est basé sur la décoloration du radical cationique acide 2,2'-azino-bis (3 éthylbenzothiazoline-6-sulphonique), (ABTS^{•+}) (Mayouf *et al.*, 2019). Une solution stock est d'abord préparée par dissolution de l'ABTS dans de l'eau distillée (7 mM) puis du persulfate de potassium (K₂S₂O₈) a été ajouté à 2,45 mM. Ce mélange est laissé sous agitation toute la nuit (12-16h) à température ambiante et à l'obscurité. Cette solution stock est diluée au moment de son utilisation dans du méthanol pour obtenir une absorbance de $0,70 \pm 0,02$ à $\lambda = 734$ nm.

Une aliquote (20 µL) de chaque extrait a été mélangée à 2 mL de la solution diluée de l'ABTS, puis incubé à 30°C pendant six minutes. L'absorbance est ensuite mesurée à $\lambda = 734$ nm contre un blanc. Une courbe standard est préparée pour des concentrations croissantes (0-2 mM) de Trolox, analogue hydrosoluble de la vitamine E. Les valeurs de la capacité antioxydante en Trolox équivalent (TEAC) sont calculées à partir de la droite standard et les résultats sont exprimés en mmol de Trolox équivalent par gramme d'extrait (mmol TroloxEq/g extrait ± SD). La capacité scavenger du radical cationique ABTS^{•+} est également exprimée en pourcentage (%) en utilisant des concentrations croissantes de chaque extrait. La concentration efficace inhibant l'oxydation de 50% de l'ABTS^{•+} (IC₅₀) est déterminée pour chaque extrait. L'Acide ascorbique, l'acide gallique et la quercétine sont utilisés comme contrôles positifs.

2.4.3. Pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP)

Le pouvoir antioxydant réducteur du fer des différents extraits de la plante HC est analysé par la méthode décrite par Boumerfeg *et al.* (2012). Le réactif FRAP est fraîchement préparé par

le mélange du tampon acétate (300 mM, pH 3.6), une solution de TPTZ (10 mM de 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-1,3,4-triazine) dans 40 mM de HCl), et la solution de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ aux proportions 10:1:1 (v/v/v). Cette méthode permet de quantifier la capacité des antioxydants à réduire le fer par le suivi de l'absorbance du réactif FRAP à $\lambda = 593$ nm. Cet essai est basé sur la réduction du complexe du fer ferrique et du TPTZ en la forme de fer ferreux à pH acide.

Un volume de 65 μL de chaque échantillon à tester est ajouté à 200 μL d'eau distillée et 2 mL du réactif de FRAP fraîchement préparé. Après incubation à 37°C pendant 30 min, l'absorbance de chaque mélange est mesurée à $\lambda = 593$ nm contre le méthanol comme blanc. Les résultats obtenus sont comparés à une courbe standard réalisée pour une gamme de concentrations croissantes (0 - 2 mM) d'une solution de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Les valeurs du pouvoir antioxydant réducteur des ions ferriques en ions ferreux, sont exprimées en mmol équivalents de Fe^{2+} par gramme d'extraits (mmol Eq. Fe^{2+} /g d'extrait). L'acide ascorbique, l'acide gallique et la quercétine sont les standards utilisés.

2.4.4. Effet inhibiteur du blanchissement du β -carotène/acide linoléique

L'activité inhibitrice de l'oxydation de la β -carotène, en émulsion dans l'acide linoléique, exercée par les extraits étudiés, a été analysée selon la méthode décrite par Arrar *et al.* (2013).

D'abord, une solution de β -carotène/acide linoléique est préparée par dissolution de 0,5 mg de β -carotène dans 1 mL de chloroforme, 25 μL d'acide linoléique et 200 mg de tween-80.

Le chloroforme est ensuite évaporé à 40°C. Enfin, 100 mL d'eau distillée saturée en oxygène a été rajouté au résidu de l'évaporation et la solution est vigoureusement agitée pour former une émulsion stable. L'effet antioxydant des différents extraits a été évalué en ajoutant 250 μL de chaque extrait (2 mg/mL) dans 2,5 mL de l'émulsion. L'absorbance initiale à t_0 est mesurée pour chaque test puis l'ensemble des échantillons est incubé à 50°C pendant 2 h.

Le BHT et le méthanol sont utilisés comme contrôles positif et négatif respectivement. La cinétique de l'oxydation de la β -carotène est suivie toutes les 15 min à $\lambda = 470$ nm.

L'activité antioxydante par inhibition du blanchissement de l'émulsion est exprimée en pourcentage (AI%). Elle est calculée selon la formule suivante : $AI\% = A_0/A_t$ (Majouli *et al.*, 2016) ; sachant que A_0 est l'absorbance initiale et A_t est l'absorbance au temps t de mesure. L'activité inhibitrice du blanchissement du β -carotène par les différents extraits testés est comparée à 60 et à 120 min d'incubation.

2.5. Etude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

2.5.1. Modèle de l'œdème de l'oreille induit au PMA

L'œdème de l'oreille chez la souris a été induit selon Trabsa *et al.*, (2020). Une masse de 4 μ g de Phorbol 12-Myristate 13-acétate (PMA) dissoute dans 20 μ L de DMSO, est appliquée aux deux faces de l'oreille droite de chaque souris. L'oreille gauche a été traitée de 20 μ L de DMSO seul et a servi de contrôle. Les différents extraits de HC dissouts dans de l'eau distillée contenant 4% de DMSO sont administrés *per os* (500 mg/Kg), une heure avant l'application du PMA.

Quatre groupes expérimentaux traités aux différents extraits méthanoliques des feuilles (ED-Fe), des tiges (ED-T), des fleurs (ED-Fl) et des racines (ED-R) de HC sont réalisés. Le groupe contrôle positif (Dic) est traité au diclofenac[®] à 100 mg/Kg dissout dans de l'eau distillée tandis que le groupe contrôle négatif (N-traité) a reçu seulement de l'eau distillée (4% DMSO).

Après 6h de l'application du PMA, les souris de chaque groupe sont sacrifiées par dislocation cervicale et un disque de 6 mm de diamètre est découpé de chaque oreille grâce à un emporte-pièce.

L'épaisseur de chaque disque est mesurée et l'épaisseur de l'œdème est calculée par soustraction de l'épaisseur de l'oreille gauche (DMSO seul) de l'épaisseur de l'oreille droite (PMA). Le taux d'inhibition de l'œdème est déterminé par comparaison à l'épaisseur de l'oreille chez les animaux du groupe non traité (PMA) selon la formule suivante :

Taux d'inhibition (%) = $(E_c - E_t/E_c) \times 100$, où E_c : moyenne de l'épaisseur de l'œdème dans le groupe contrôle négatif (non traité) et E_t : épaisseur moyenne de l'œdème dans le groupe traité (diclofénac ou extraits).

2.5.2. Modèle de l'œdème de l'oreille induit à l'huile de croton

L'huile de croton a été utilisée pour l'induction d'une inflammation aiguë de l'oreille chez la souris selon le modèle décrit par Bouriche *et al.* (2016). Une quantité de 107 µg de l'huile de croton dissoute dans 20 µL d'acétone/eau (1:1), est appliquée à une face de l'oreille droite de chaque souris. L'oreille gauche a été traitée par 20 µL du mélange acétone : eau (1:1) sans huile de croton et a servi de contrôle négatif. Un groupe contrôle positif est traité à l'indométacine (50 mg/Kg). Les groupes expérimentaux ont reçu deux doses (200 et 400 mg/Kg) des différents extraits de HC dissout dans de l'eau distillée (4% DMSO) administrés *per os*, une heure avant l'application de l'agent irritant.

Les souris (n = 6) traités aux différents extraits méthanoliques de HC sont réparties en huit groupes expérimentaux comme suit : ED-Fe 200 et 400, ED-T 200 et 400, ED-FI 200 et 400 et ED-R 200 et 400. En plus d'un groupe contrôle positif (Indo) traité à l'indométhacine® à 50 mg/Kg dissoute dans du NaCl (0.9%) et un groupe contrôle négatif (N-traité) recevant seulement de l'eau distillée (4% DMSO). Après 6h de l'application de l'huile de croton, l'épaisseur de l'œdème et le pourcentage de l'inhibition de l'œdème sont calculés selon la formule utilisée pour le modèle au PMA.

2.5.3. Modèle de l'œdème de la patte induit à la carragénine

Le modèle de l'œdème de la patte chez le rat a été induit selon le modèle utilisé par Amraoui *et al.* (2019). 100 µL d'une solution de carragénine (1%) dans du NaCl (0,9%) est injecté dans la partie sub-plantaire de la patte droite de chaque rat. Les différents extraits de HC dissouts dans de l'eau distillée (4% DMSO) sont administrés *per os*, une heure avant l'injection de la carragénine.

Le groupe contrôle positif (Dic) a reçu du diclofénac[®] (25 mg/Kg) tandis que le groupe contrôle négatif (N-traité) a reçu seulement de l'eau distillée (4% DMSO). Les groupes expérimentaux sont traités par deux doses différentes (200 et 400 mg/Kg) et sont désignés de la même façon que les deux modèles précédents.

L'épaisseur de chaque patte traitée à la carragénine est mesurée par un pied à coulisse digital, et l'épaisseur de l'œdème est calculée par soustraction de l'épaisseur de la patte droite avant injection de la carragénine de l'épaisseur de la même patte après induction de l'œdème. Le pourcentage de l'inhibition de l'œdème est déterminé par comparaison au groupe contrôle négatif. Il a été déterminé selon la formule utilisée pour les deux modèles précédents.

2.5.4. Modèle de l'arthrite rhumatoïde induite à l'adjuvant complet de Freund

Le modèle de l'arthrite rhumatoïde chez le rat, a été induit par injection intradermique de 0.1 mL de l'ACF (1 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* tué par la chaleur) dans la face sub-plantaire de la patte droite de chaque rat (Amraoui *et al.*, 2019).

L'effet préventif et thérapeutique des différents extraits de HC dans ce modèle ont été évalués à 200 mg/Kg. Quatre groupes (n= 6) ont été réalisés pour l'étude préventive (pED-Fe, pED-T, pED-FI et pED-R). Ces rats ont reçu par voie orale une dose journalière de 200 mg/Kg de chacun des extraits de HC, 1 heure avant l'induction de l'arthrite rhumatoïde et jusqu'à la fin

de l'étude. Quatre autres groupes sont réalisés pour l'étude curative (cED-Fe, cED-T, cED-FI et cED-R), (Amraoui *et al.*, 2019). Ces rats ont également reçu par voie orale une dose journalière de 200 mg/Kg de chacun des extraits de HC, à partir de J13 après induction de l'arthrite (Bhangale et Achrya, 2014 ; Abdelghafar *et al.*, 2018). Quatre autres groupes ont été utilisés ; un groupe témoin négatif (ACF) et deux groupes témoins positifs, un pour l'étude préventive (ACF + 3mg/Kg diclofénac à partir de J0) et un autre pour l'étude curative (ACF + 3mg/Kg diclofénac à partir de J13) et enfin un groupe normal (NaCl 0.9%). Les animaux ont été sacrifiés à J28, fin de l'étude.

2.5.4.1. Paramètres cliniques

Les rats des différents groupes expérimentaux ont été suivis tout au long des 28 jours. Leur poids corporel, l'épaisseur de l'œdème ont été enregistrés à partir de J0 et tous les 3/4 jours jusqu'à la fin de l'étude (J3, J7, J10, J14, J17, J21, J24, J28). Le taux du gonflement de la patte a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Gonflement de la patte (\%)} = (E_t - E_{t0})/E_{t0} \times 100,$$

Où E_{t0} est l'épaisseur de la patte avant injection de l'ACF et E_t est l'épaisseur de la patte à un temps t après injection de l'ACF.

Le taux d'inhibition de l'œdème a été également calculé pour chaque groupe traité par rapport au groupe non traité (témoin négatif) selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition de l'œdème (\%)} = (E_c - E_t/E_c) \times 100,$$

Où E_c est la moyenne de l'épaisseur de l'œdème dans le groupe contrôle négatif (non traité) et E_t est l'épaisseur moyenne de l'œdème dans le groupe traité (diclofénac ou extraits).

Par ailleurs, le poids corporel des rats a été suivi deux fois par semaine pendant toute la période de l'expérimentation. Le gain de poids corporel (%) a été calculé à J7, J14, J21 et J28 pour chaque groupe expérimental par comparaison à la moyenne du poids corporel initial, selon la formule suivante :

Gain de poids corporel (%) = (Poids à Jx - poids corporel initial) / poids corporel initial x 100.

De plus, le foie, la rate et le thymus ont été prélevés pour chaque rat et le poids relatif (%) de chaque organe par rapport au poids corporel du rat correspondant a été également déterminé selon la formule suivante :

Poids relatif de l'organe (%) = (poids de l'organe / poids corporel) x 100

2.5.4.2. Paramètres plasmatiques

Le prélèvement sanguin est effectué par ponction cardiaque dans des tubes à EDTA, au moment du sacrifice des animaux. Le sang recueilli est conservé à +4°C avant centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min. Le plasma séparé par centrifugation est ensuite aliquoté dans des microtubes Eppendorf® puis congelé à -20°C en vue du dosage du malondialdéhyde (MDA), du monoxyde d'azote et pour l'évaluation de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) plasmatique.

a) Dosage du MDA plasmatique

Le contenu plasmatique en MDA a été analysé afin d'évaluer le taux de la peroxydation lipidique chez les différents groupes expérimentaux. Cette analyse a été réalisée selon Guemmaz *et al.* (2018). Un volume de 0.5 mL de TCA (20%) et de 1 mL de TBA (0.67%) ont été ajoutés à 0.5 mL de sérum. Le mélange est ensuite incubé à 95°C pendant une heure. Après incubation, les échantillons sont refroidis dans un bain de glace pendant 10 min. Le complexe MDA-TBA est ensuite extrait par ajout d'un volume égal de n-butanol.

Ce mélange est vigoureusement agité au vortex puis centrifugé à 10000 rpm pendant 15 min.

Le surnageant est récupéré et l'absorbance est lue à $\lambda = 532$ nm.

La concentration de MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction de l'adduit MDA-TBA ($156 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), et est ensuite exprimée en nmol/mL de sérum (Guemmaz *et al.*, 2018).

b) Evaluation de l'activité de la MPO plasmatique

L'activité de la myéloperoxydase (MPO) plasmatique a été évaluée par la méthode à l'O-dianisidine en présence de H_2O_2 selon Kusuma *et al.* (2009). Un volume de 0.1 mL de chaque échantillon est mélangé à 2.9 mL de tampon phosphate (50 mM, pH = 6) contenant 0.167 mg/mL de O-dianisidine Dihydrochloride et 0.1% de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'absorbance de chaque échantillon a été mesurée chaque minute et pendant 3 min à $\lambda = 470$ nm. Une unité de l'activité de la MPO correspond à une micromole de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dégradée par min et à 25°C . Les valeurs obtenues sont calculées en utilisant la formule suivante :

$$\text{MPO (U/L)} = (\Delta A/\text{min} \times 3000 \mu\text{L} \times 106 \mu\text{mol/mol}) / (11300 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times 100 \mu\text{L}).$$

$$= \Delta A/\text{min} \times 2832 \mu\text{mol/min}$$

$$= \Delta A/\text{min} \times 2832 \text{ U/L}.$$

Où $\Delta A/\text{min} = A_3 - A_2 / 2$; A_3 = absorbance à trois min et A_2 = absorbance à une min. $11300 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ est le coefficient d'extinction molaire de la MPO. Les résultats sont exprimés en U/L (Kusuma *et al.*, 2009).

c) Dosage du NO plasmatique

Le dosage du NO est un test colorimétrique permettant de mesurer le taux des ions nitrites (NO^{2-}), un des produits stables issus de la dégradation du NO. Ce test est basé sur la réaction de diazotization, réalisée grâce au réactif de Griess contenant du sulfanilamide ou Griess B (1% dans 5% H_3PO_4 ou HCl) et du N-1-Naphtylethylènediamine dihydrochloride ou Griess A (NEDD, 0.1% dans de l'eau distillée).

Le dosage est réalisé à l'abri de la lumière où 100 μl de chaque échantillon (plasma) sont mélangés à 50 μl de Griess B plus 50 μl de Griess A et 800 μl d'eau distillée. Après mélange au vortex. L'ensemble des tubes est incubé à l'obscurité pendant 20 à 30 min. L'absorbance de chaque échantillon est ensuite mesurée au spectrophotomètre à $\lambda = 543 \text{ nm}$ (Abdelouhab *et al.*, 2012).

Une courbe standard est tracée au préalable, pour une série de concentrations d'une solution de NaNO_2 , indiquant l'absorbance en fonction de la concentration des NO^{2-} . La concentration des nitrites correspondant à chaque échantillon est calculée à partir de cette courbe standard et est exprimée en μM .

2.5.4.3. Etude histologique

La patte droite de chaque rat a été récupérée à la fin du sacrifice et est directement fixée dans du formol (10%) pendant au moins 48h puis décalcifiée dans de l'acide nitrique (HNO_3 à 15%) pendant une semaine. Après une série de passages dans des bains d'alcool et de xylène dans l'automate, les pattes sont enrobées en blocs de paraffine. Des coupes histologiques de l'articulation sont ensuite réalisées pour chaque patte, puis étalées sur des lames en verre. Après séchage, les lames préparées sont colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) en vue d'une observation morphologique au microscope optique.

3. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de la moyenne \pm écart-type ($n = 3$ pour l'analyse *in vitro* et $n = 6$ pour l'étude *in vivo*). L'analyse statistique est réalisée par le logiciel GraphPad Prism.5 en appliquant l'analyse de la variance (ANOVA) suivie par le test de Tuckey. Le test de Dunnett's est utilisé pour comparer les groupes test aux contrôles, où une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

II. Résultats et Discussion

1. ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *HERTIA CHEIRIFOLIA*

L'étude est réalisée sur des extraits méthanoliques obtenus à partir des feuilles, des tiges, des fleurs, et des racines de *Hertia cheirifolia*. Le rendement de l'extraction a été calculé pour chaque partie de la plante. Leur contenu en polyphénols et en flavonoïdes a été également déterminé puis une analyse des composés phénolique est réalisée par HPLC-DAD. En raison de la difficulté de leur solubilisation dans l'eau pour l'étude *in vivo*, les extraits bruts ont été délipidés par du n-hexane. Les extraits bruts et délipidés ont fait l'objet de l'étude pour toute la partie *in vitro*.

1.1. Rendement de l'extraction

L'extraction réalisée par macération dans du méthanol pur (10% m/v), à partir des différentes parties (feuilles, tiges, fleurs et racines) de la plante *H. cheirifolia*, a permis d'obtenir différents rendements pour chaque extrait. Le rendement le plus important est obtenu à partir des fleurs comparé à ceux des feuilles, des tiges et des racines (**Tableau 3**). La différence du rendement d'extraction pourrait être liée à la structure chimique très diversifiée des molécules bioactives d'origine végétale, leur degré de polarité et le contenu de chaque partie de la plante en ces différentes substances bioactives (Truong *et al.*, 2019 ; Osmić *et al.*, 2019). Par ailleurs, le méthanol est considéré comme le meilleur solvant d'extraction, grâce à son caractère amphiphile, permettant l'extraction de la majorité des composés polaires ainsi que certains composés apolaires (Dhawan et Gupta, 2017 ; Thouri *et al.*, 2017).

Une partie de chaque extrait brut a été délipidée par des lavages répétés par du n-hexane dans une ampoule à décanter. Deux phases différentes sont obtenues ; une phase non polaire correspondant à la fraction lipidique et une phase méthanolique polaire correspondant à l'extrait délipidé (ED).

Le pourcentage le plus important en lipides est retrouvé dans l'extrait des feuilles, tandis que les extraits des tiges, des fleurs et des racines ont présenté des contenus assez proches (**Tableau 3**).

Tableau 3. Rendement de l'extraction et contenu en lipides des différentes parties de *H. cheirifolia*.

Partie de la plante	Rendement (%) de l'extrait	Lipides (%)
Feuilles	16.33 ± 0.63 ^a	16 ± 0.64 ^a
Tiges	13.82 ± 0.90 ^a	5.06 ± 0.2 ^b
Fleurs	20.47 ± 2.07 ^b	6.03 ± 0.24 ^b
Racines	12.41 ± 0.97 ^a	5.21 ± 0.21 ^b

Une lettre différente indique une différence significative ($p < 0.05$) des valeurs dans la même colonne.

Il est reconnu que les molécules les moins polaires sont mieux récupérées par les solvants non polaires et vice versa. Le n-hexane est l'un des solvants apolaires les plus utilisés pour l'extraction des lipides végétaux (Papageorgiou et Assimopoulou, 2003 ; Satriana *et al.*, 2018).

1.2. Contenu en polyphénols et en flavonoïdes totaux

Les polyphénols sont des molécules organiques de structure hétérogène produites par les plantes durant leur métabolisme secondaire (Abbas *et al.*, 2017 ; Panche *et al.*, 2016). L'extraction des polyphénols peut être réalisée à partir des différentes parties d'une plante. Pour ce faire, les échantillons sont souvent séchés puis broyés en poudre fine afin de permettre un contact maximum entre le solvant d'extraction et les particules de la poudre végétale, pour une extraction optimale (Vongsak *et al.*, 2013 ; Iloki-Assanga *et al.*, 2015).

L'évaluation du contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes de chacun des extraits préparés de *H. cheirifolia* est obtenue à partir des deux droites standards (**Annexe 1**). Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 4**. D'abord, aucune différence du contenu en polyphénols n'a été observée entre les extraits bruts (EBr) et délipidés (ED), à l'exception de l'extrait des fleurs où une différence significative ($p < 0.05$) a été notée (28.48 ± 0.78 mg EAG/g d'extrait sec vs 34.76 ± 1.5 mg EAG/g d'extrait sec).

La teneur la plus élevée en polyphénols a été obtenue dans l'extrait délipidé des feuilles (ED-Fe), (50.61 ± 6.21 mg EAG/g d'extrait sec). Cette valeur est significativement supérieure ($p < 0.01$) aux valeurs retrouvées dans les extraits délipidés des fleurs (ED-FI) et des racines (ED-R) (34.76 ± 1.5 mg EAG/g d'extrait sec et 32.39 ± 3.62 mg EAG/g d'extrait sec respectivement), ainsi qu'à celle obtenue dans l'extrait délipidé des tiges (ED-T) ($p < 0.001$), (**Tableau 4** et **Figure 14**).

Tableau 4. Contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits bruts (EBr) et délipidés (ED) des différentes parties de *H. cheirifolia*.

Extrait	Contenu en polyphénols (mg EAG/g d'extrait sec)		Contenu en flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait sec)	
	EBr	ED	EBr	ED
Feuilles	46.93 ± 0.36	50.61 ± 6.2	10.82 ± 0.84	9.75 ± 0.03
Tiges	23.56 ± 1.96	26.52 ± 0.29	2.47 ± 0.35	2.79 ± 0.18
Fleurs	28.48 ± 0.78	34.76 ± 1.5	3.23 ± 0.4	3.63 ± 0.2
Racines	26.45 ± 0.81	32.39 ± 3.62	2.69 ± 0.33	3.79 ± 0.16

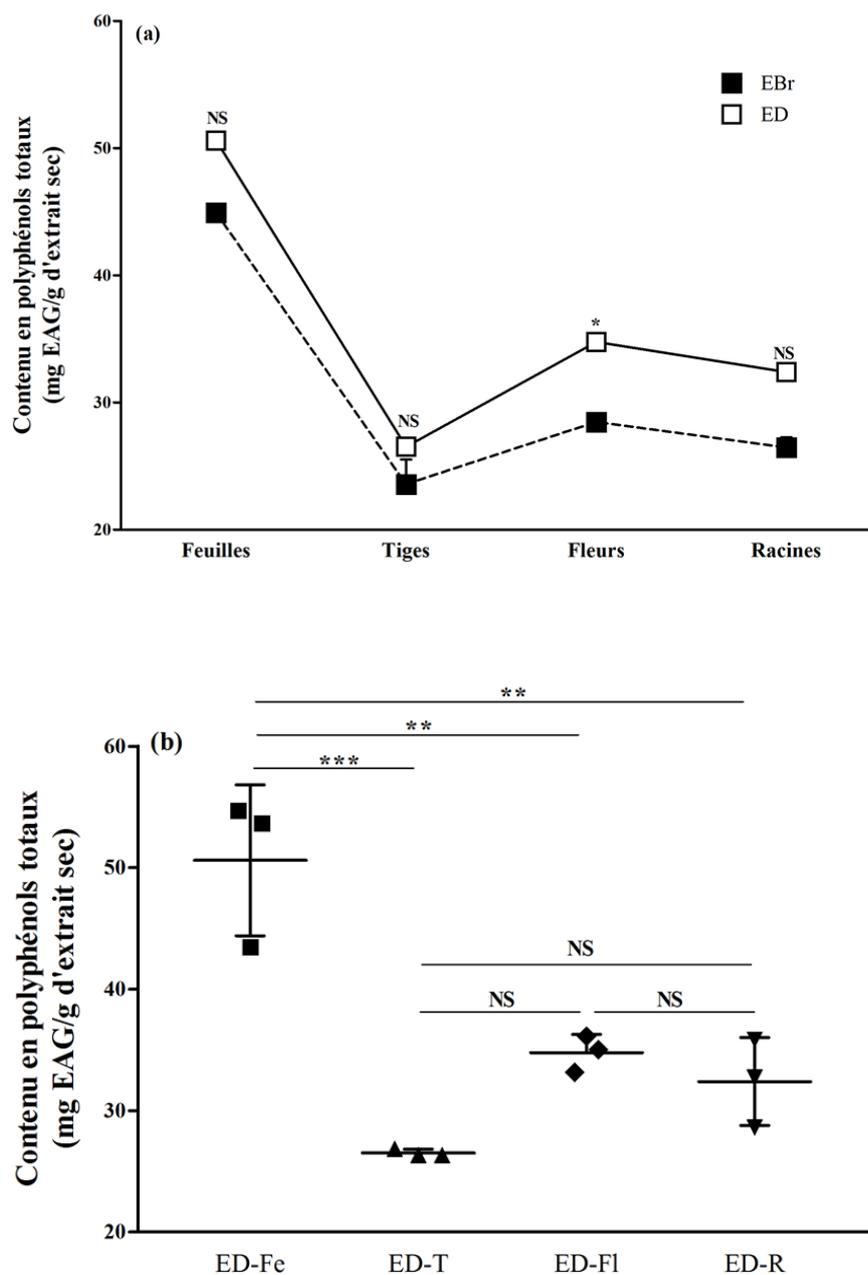


Figure 14. Contenu en polyphénols totaux des extraits bruts (EBr) (a) et délipidés (ED) (b) des feuilles (Fe), des tiges (T), des fleurs (FI) et des racines (R) de *H. cheirifolia*. (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

Par ailleurs, l'évaluation des teneurs en flavonoïdes montre que l'extrait brut et délipidé de chaque partie de *H. cheirifolia* renferment des contenus assez proches. Néanmoins, une différence significative ($p < 0.05$) a été notée entre les extraits EBr-Fe et ED-Fe (10.82 ± 0.84 mg EQ/g d'extrait sec vs 9.75 ± 0.03 mg EQ/g d'extrait sec, respectivement) et EBr-R et ED-R (2.69 ± 0.33 mg EQ/g d'extrait sec vs 3.79 ± 0.16 mg EQ/g d'extrait sec, respectivement). Le contenu le plus élevé en flavonoïdes est également obtenu dans l'extrait ED-Fe, suivi par les extraits ED-Fl et ED-R. L'extrait ED-T a présenté la teneur la plus faible (**Tableau 4** et **Figure 15**). Une corrélation positive a été notée entre le contenu en polyphénols et en flavonoïdes dans chaque extrait ($r = 0.9746$, $p < 0.05$), (**Annexe 2**).

Les résultats obtenus révèlent que les extraits méthanoliques préparés à partir des différentes parties de *H. cheirifolia* représentent une source non négligeable de polyphénols. Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans d'autres études sur les extraits de feuilles et de la partie aérienne de la plante (Bousselsela *et al.*, 2012; Kada *et al.*, 2016). Par contre, l'extrait ED-R montre un CPT et CFT plus important que celui observé par Majouli *et al.* (2017). Une certaine variabilité peut être due à la méthode d'extraction, la zone géographique, le stade de maturation de la plante et les conditions climatiques de l'année de la récolte.

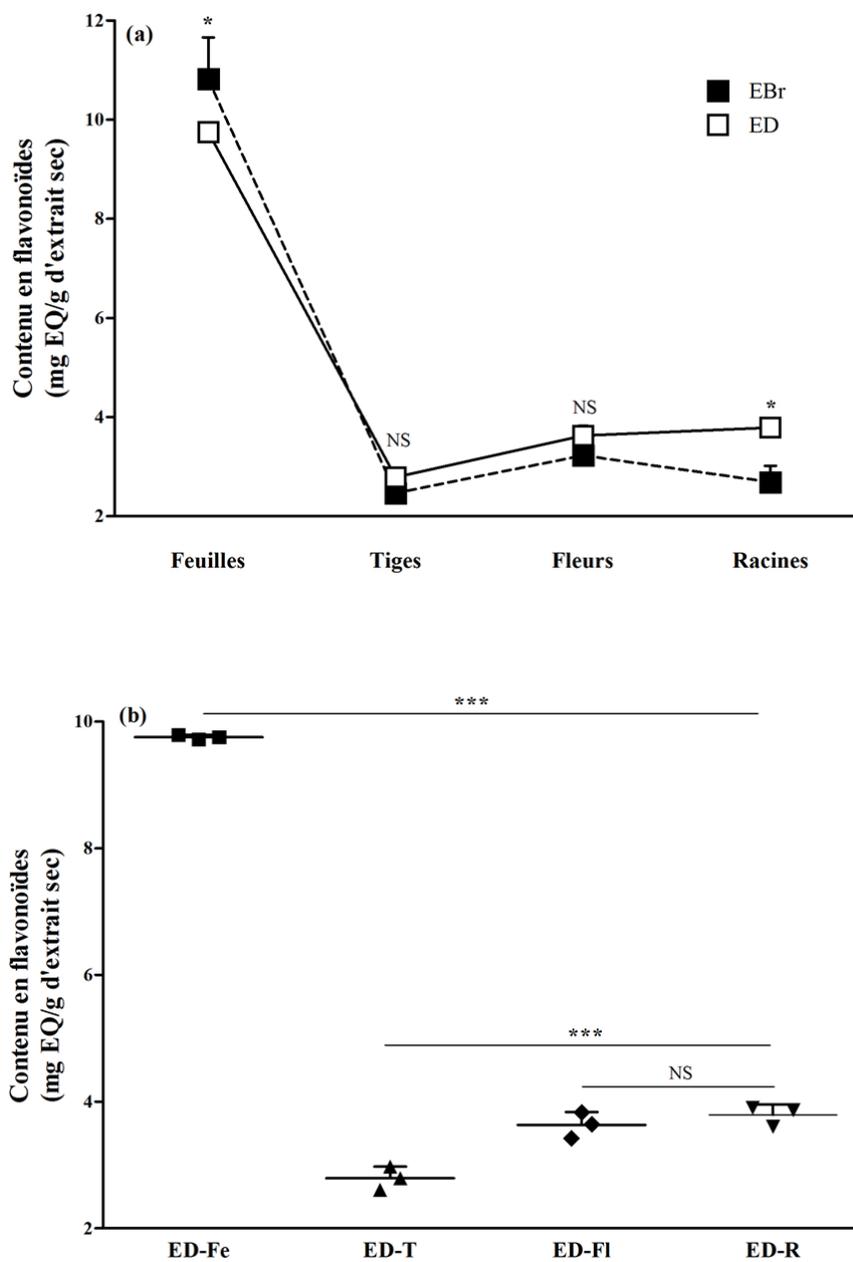


Figure 15. Contenu en flavonoïdes des extraits bruts (EBr) (a) et délipidés (ED) (b) des feuilles (Fe), des tiges (T), des fleurs (Fl) et des racines (R) de *H. cheirifolia*. (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; *** : $p < 0.001$).

1.3. Analyse par HPLC-DAD

La chromatographie liquide haute performance avec détecteur à barrettes de diode (HPLC-DAD) est une technique couramment utilisée dans l'analyse des composés phénoliques dans les extraits végétaux (Naczki et Shahidi, 2004 ; Parejo *et al.*, 2004). Le temps de rétention et les spectres d'absorption correspondant à différents composés standards rendent cette technique très fiable pour l'identification des molécules bioactives contenues dans chaque échantillon analysé (Chirinos *et al.*, 2009).

L'analyse par HPLC-DAD des différents extraits de *Hertia cheirifolia* a permis l'identification de sept composés phénoliques différents, dont quatre acides phénoliques et trois flavonoïdes (**Figure 16**). Cette identification a été établie par comparaison du temps de rétention et des spectres-UV de référence des standards (acide caféique et rutine) à ceux des différents extraits analysés (**Annexe 3**). Les chromatogrammes ont été acquis à 350 et 320 nm et une très bonne résolution des pics est obtenue.

Le profil chromatographique de chaque extrait montre une composition variable et diversifiée ; les quatre acides phénoliques identifiés seraient des dérivés de l'acide caféique et les trois flavonoïdes correspondraient à la rutine et à deux dérivés de la rutine. Ces résultats corroborent ceux obtenus par des études antérieures (Bouriche *et al.*, 2016 ; Majouli *et al.*, 2017a ; Majouli *et al.*, 2017c).

La comparaison des chromatogrammes obtenus pour l'extrait brut (EBr) et délipidé (ED) de chaque partie analysée de *H. cheirifolia* ne montre aucune différence (**Annexe 3**). L'aire de chaque pic des chromatogrammes obtenus a permis la quantification des composés phénoliques identifiés en mg/g de poids sec de chaque extrait. Aucune différence entre les extraits EBr et ED n'a été observée, à l'exception des composés AcCaf1, rutine, Ru1 et Ru2

où les contenus des extraits délipidés sont plus élevés par rapport aux extraits bruts correspondants ($p < 0.001$), (**Tableau 5**). Par ailleurs, il apparaît que les quatre extraits de *H. cheirifolia* contiennent des quantités différentes de composés phénoliques (**Tableau 5**).

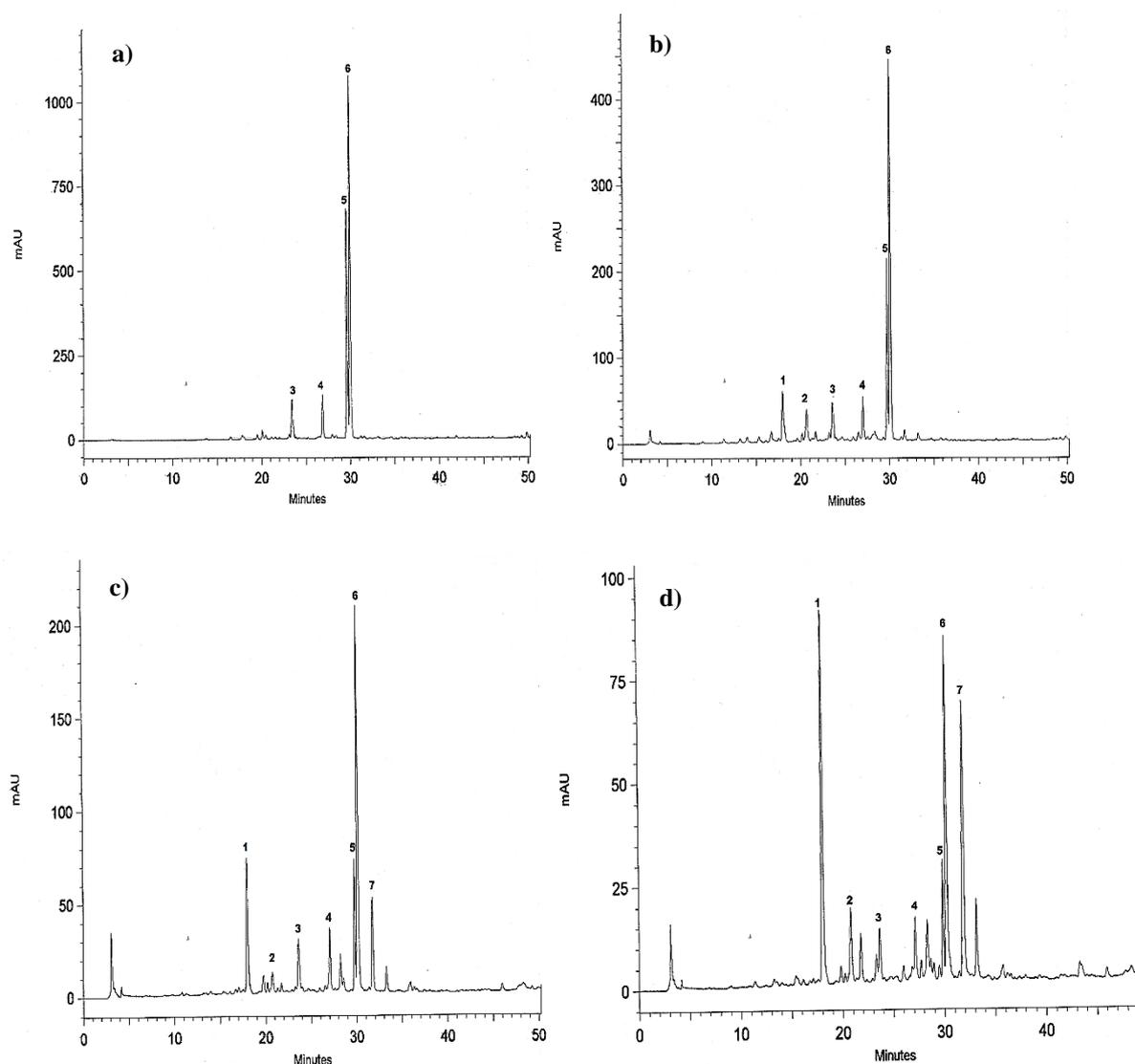


Figure 16. Profil phénolique des extraits méthanoliques délipidés (ED) de *Hertia cheirifolia* analysés par HPLC-DAD ($\lambda = 350$ nm). **a)** Feuilles, **b)** Tiges, **c)** Fleurs, **d)** Racines.

Tableau 5. Composition en acides phénoliques et en flavonoïdes des extraits méthanoliques délipidés (ED) et bruts (EBr) de *Hertia cheirifolia*, analysés par HPLC-DAD.

λ max (nm)	Composés phénoliques	Concentration dans l'extrait (mg/g)				
		Feuilles	Tiges	Fleurs	Racines	
326	1 : Dérivé de l'acide caféique 1	ED	-	3.13 ± 0.15a	3.16 ± 0.16a	4.55 ± 0.22a
		EBr	-	1.27 ± 0.06	2,35 ± 0.10	2.56 ± 0.12
324	2 : Dérivé de l'acide caféique 2	ED	-	2.27 ± 0.11a	0.45 ± 0.02a	1.42 ± 0.07a
		EBr	-	1.73 ± 0.08	0.24 ± 0.01	1.25 ± 0.06
326	3 : Dérivé de l'acide caféique 3	ED	6.33 ± 0.31b	2.27 ± 0.13a	1.35 ± 0.06a	0.82 ± 0.04a
		EBr	4.41 ± 0.22	2.15 ± 0.1	0.95 ± 0.05	0.65 ± 0.03
254	4 : Rutine	ED	4.20 ± 0.21b	2.14 ± 0.10a,b	1.72 ± 0.08a	0.41 ± 0.02a
		EBr	3.90 ± 0.2	1.12 ± 0.06	0.91 ± 0.04	0.2 ± 0.01
265	5 : Dérivé de la rutine 1	ED	23.96 ± 1.19d	7.19 ± 0.36c	2.58 ± 0.13b	0.26 ± 0.01a
		EBr	17.68 ± 0.9	4.65 ± 0.24	1.48 ± 0.07	0,2 ± 0,01
254	6 : Dérivé de la rutine 2	ED	39.79 ± 1.98d	16.39 ± 0.82c	8.42 ± 0,42b	3,86 ± 0,19a
		EBr	29.98 ± 1.5	7.94 ± 0.4	4.45 ± 0.22	2.75 ± 0.15
327	7 : Dérivé de l'acide caféique 4	ED	-	-	2.10 ± 0.01a	3.51 ± 0.17a
		EBr	-	-	1.88 ± 0.01	3.21 ± 0.20
Polyphénols totaux (mg/g)		ED	74.28 ± 3.69d	33.39 ± 1.67c	19.78 ± 0.88b	14.83 ± 0.72a
		EBr	55.97 ± 2.82	18.86 ± 0.94	12.26 ± 0.50	10.82 ± 0.58
Acides phénoliques totaux (mg/g)		ED	6.33 ± 0.31a	7.67 ± 0.39a	7.06 ± 0.25a	10.30 ± 0.50b
		EBr	4.41 ± 0.22	5.15 ± 0.24	5.42 ± 0.17	7.67 ± 0.41
Flavonoïdes totaux (mg/g)		ED	67.95 ± 3.38d	25.72 ± 1.28c	12.72 ± 0.63b	4.53 ± 0.22a
		EBr	51.56 ± 2.60	13.71 ± 0.70	6.84 ± 0.33	3.15 ± 0.17

Une lettre différente indique une différence significative ($p < 0.05$) entre les valeurs dans la même ligne.

La quantité la plus élevée est obtenue dans les feuilles (EBr et ED), où quatre pics différents sont observés. Les deux pics majeurs (5 et 6) correspondent à deux flavonoïdes dérivés de la rutine (Ru1 et Ru2) tandis que les deux autres (3 et 4) correspondent à un dérivé de l'acide caféique (AcCaf3) et à la rutine. La quantité de ces composés est significativement différente ($p < 0.001$) des quantités retrouvées dans le reste des extraits. Néanmoins, bien que l'extrait des feuilles soit le plus riche en polyphénols, sa composition est la moins diversifiée par rapport aux autres parties de la plante où les composés 1, 2 et 7 ont été détectés.

Dans l'extrait de tiges, les deux composés correspondant aux pics 5 et 6 sont également majoritaires, et leur quantité est significativement différente ($p < 0.001$) des quatre autres constituants identifiés. Ces quatre pics (1-4) correspondent à trois composés dérivés de l'acide caféique (AcCaf1, AcCaf2, AcCaf3, respectivement) et à la rutine.

Le profil chromatographique de l'extrait des fleurs montre la présence des sept composés identifiés, où le constituant majeur est le flavonoïde dérivé de la rutine correspondant au pic 6, suivi de l'acide phénolique AcCaf1, du dérivé de la rutine Ru1 puis du dérivé de l'acide caféique AcCaf4 (pics 1, 5 et 7 respectivement). L'extrait de racines contient également la totalité des sept composés identifiés. Les composés correspondant au pic 1, 6 et 7 (AcCaf1, Ru2 et AcCaf4 respectivement) sont majoritaires.

Les résultats obtenus par HPLC-DAD sont en accord avec l'évaluation des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux, qui a montré que l'extrait ED-Fe est le plus riche en composés phénoliques. Cette richesse est clairement liée à son contenu total en flavonoïdes (67.95 ± 3.38 mg/g d'extrait), significativement supérieur ($p < 0.001$) au contenu des autres extraits (**Tableau 5**).

L'acide caféique (3,4-dihydroxy acide cinnamique) est un composé phénolique non vitaminique, largement retrouvé dans le règne végétal. Il est issu du métabolisme de l'acide *p*-coumarique provenant de la voie de l'acide shikimique du métabolisme secondaire (Silva *et al.*, 2014 ; Khan *et al.*, 2016). L'acide caféique et ses dérivés, dont les plus étudiés sont l'acide chlorogénique, l'acide férulique, l'acide rosmarinique, et le phénétyl ester d'acide caféique, sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires potentielles (Khan *et al.*, 2016 ; Taofiq *et al.*, 2017 ; Dhingra *et al.*, 2018). Par ailleurs, la rutine, appelée également rutoside est un glycoside de la quercétine (quercétine-3-O-rutinoside). C'est un bi-flavonoïde glycosylé connu également pour ses propriétés pharmacologiques, notamment ses activités antioxydantes et anti-inflammatoires très importantes. La rutine et la quercétine sont largement utilisés comme ingrédients de préparations multi-vitaminiques ou de remèdes à base de plantes (Omoba *et al.*, 2015 ; Mostafa, 2017).

2. ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante des différents extraits de *H. cheirifolia* a été évaluée grâce à différents tests *in vitro*. D'abord, l'effet neutralisant des radicaux libres DPPH[•] et ABTS^{•+} a été analysé, puis le pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP) et l'activité antioxydante par inhibition du blanchissement de la β -carotène/acide linoléique en émulsion ont été également testés.

2.1. Activité anti-radicalaire

2.1.1. Effet neutralisant du radical libre DPPH[•]

Les radicaux libres en excès jouent un rôle néfaste pour les systèmes biologiques d'où l'intérêt de rechercher un effet neutralisant par les différents extraits végétaux étudiés. Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable, rendant ce test simple et largement utilisé dans l'étude des activités antioxydantes des substances naturelles (Gülçin *et al.*, 2010; Nur Alam *et al.*, 2013). Cet essai est basé sur la réduction du DPPH[•] en solution dans du méthanol contenant un antioxydant donneur d'hydrogène (AH) résultant en la forme non radicalaire du DPPH. L'effet antioxydant est donc proportionnel au changement de couleur violette vers le jaune, mesuré au spectrophotomètre à 517 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995 ; Sanchez-Moreno *et al.*, 1998).

Les résultats obtenus par le test du DPPH ont montré que les quatre parties étudiées de la plante, sont capables d'exercer un effet neutralisant du radical libre DPPH[•]. Cette activité est dose-dépendante allant de 25% à environ 100% (**Figure 17**). Les extraits bruts ont montré le même profil d'activité anti-radicalaire que celui des extraits délipidés. Cependant, les valeurs des IC₅₀, concentration inhibant l'oxydation de 50% de la concentration initiale du DPPH[•], ont révélé que l'extrait ED-R possède l'activité la plus élevée ($185,71 \pm 1,45 \mu\text{g/mL}$) parmi les quatre extraits analysés. Cette valeur est significativement supérieure ($p < 0.01$) aux autres valeurs obtenues pour les extraits ED-Fe, ED-T et ED-FI (**Tableau 6**).

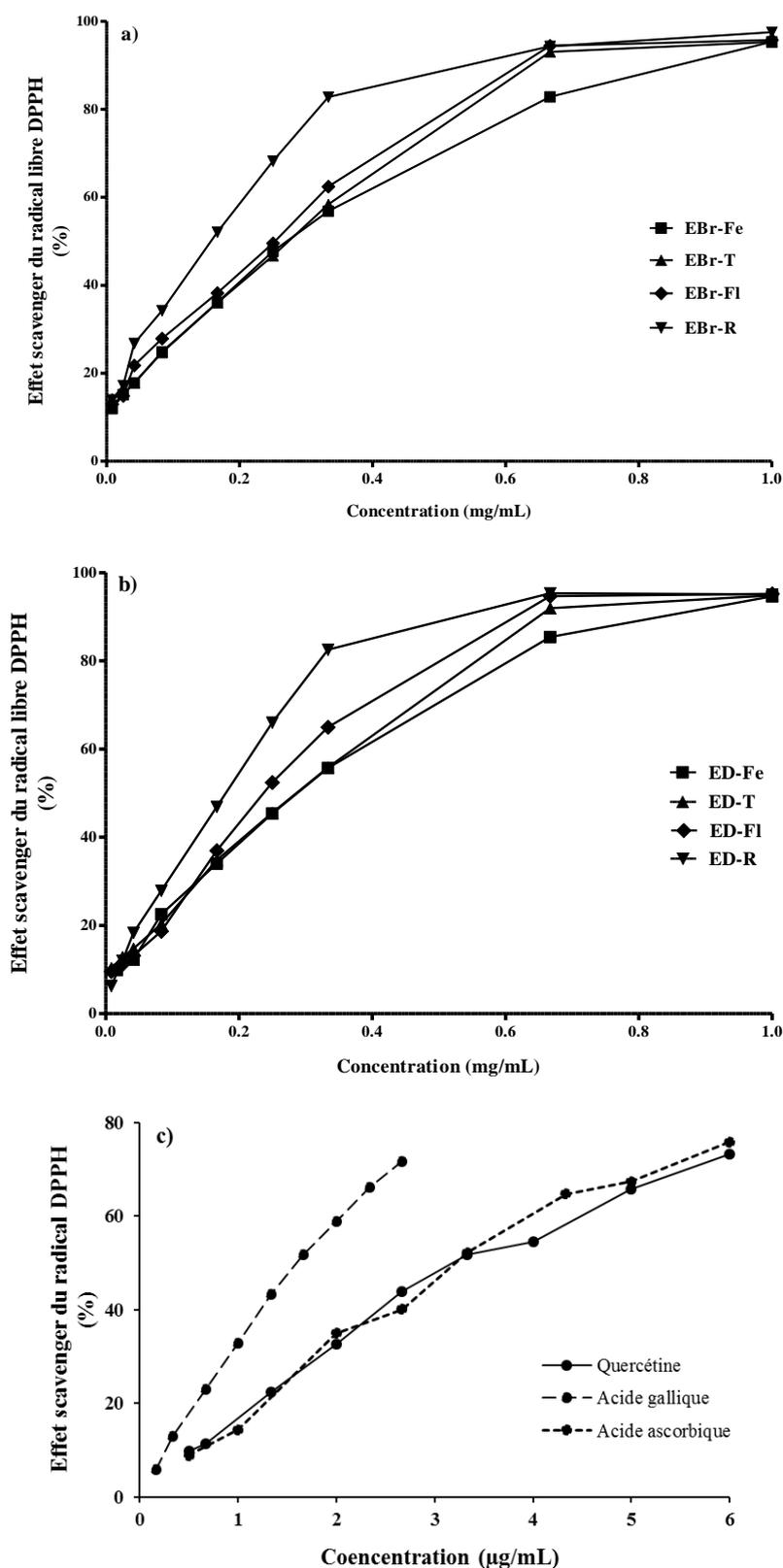


Figure 17. Activité neutralisant le radical libre DPPH' en fonction de la concentration des extraits méthanoliques de *Hertia cheirifolia*. **a)** Extraits bruts (EBr). **b)** Extraits délipidés (ED). **c)** Standards. (Fe : feuilles, T : tiges, Fl : fleurs, R : racines).

La fraction lipidique (Hex) de chaque extrait a été également testée pour son activité *vis-à-vis* du DPPH. Les résultats obtenus ont révélé que les valeurs des IC₅₀ des fractions lipidiques sont trop élevées (de l'ordre du mg) par rapport aux valeurs obtenues avec les extraits bruts et délipidés (de l'ordre du µg), exprimant ainsi une capacité anti-radicalaire négligeable (**Tableau 6**). Par ailleurs, ces résultats montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre l'activité scavenger du radical DPPH[•] et les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes ($r = 0.3983$ et $r = 0.4510$ respectivement, $p > 0.05$), (**Annexe 4**). Ceci est en accord avec les résultats exprimés en TEAC (µmol TEq./g extrait), qui ont montré que les quatre extraits analysés de *H. cheirifolia* possèdent une activité inhibitrice de l'oxydation du radical DPPH[•] similaire (~ 35 µmol TEq./g), (**Tableau 6**). De plus, l'activité anti-radicalaire exercée par les fractions lipidiques ont montré que les valeurs en TEAC (µmol TEq./g) sont deux à trois fois plus faibles que celles obtenues par les extraits bruts et délipidés de chaque partie de la plante. Les standards utilisés dans ce test, ont présenté un effet très puissant ; l'activité de l'acide gallique étant la plus importante, suivie de la quercétine et de l'acide ascorbique avec un effet anti-radicalaire équivalent (**Tableau 6**).

Tableau 6. Activité neutralisant le radical DPPH[•] exercée par les extraits méthanoliques bruts et délipidés et par la fraction lipidique de chaque extrait de *Hertia cheirifolia*.

Extrait/Fraction	Activité anti-radical libre (DPPH [•])	
	IC ₅₀ (mg/mL)	TEAC (μmolTE/g)
EBr-Fe	0.320 ± 0.002 ^{NS}	32.98 ± 0,80 ^{NS}
ED-Fe	0.331 ± 0.004 ^{NS,d}	34.79 ± 0,84 ^{NS}
Hex-Fe	2.402 ± 0.017	18.31 ± 2,19
EBr-T	0.301 ± 0.016 ^{NS}	35.65 ± 0.47 ^{NS}
ED-T	0.310 ± 0.001 ^{NS,c}	36.18 ± 0.84 ^{NS}
Hex-T	1.781 ± 0.006	15.3 ± 0.32
EBr-Fl	0.280 ± 0.018 ^{NS}	36.23 ± 0.00 ^{NS}
ED-Fl	0.288 ± 0.001 ^{NS,b}	37.02 ± 0.26 ^{NS}
Hex-Fl	2.351 ± 0.020	13.00 ± 2.42
EBr-R	0.166 ± 0,005 ^{NS}	36.25 ± 0.28 ^{NS}
ED-R	0.185 ± 0,001 ^{NS,a}	36.38 ± 0.48 ^{NS}
Hex-R	1.926 ± 0,018	16.37 ± 1.80
Standards	IC₅₀ (μg/mL)	TEAC (mmolTE/g)
Acide gallique	1.69 ± 0.01 ^a	20.32 ± 0.45 ^a
Quercétine	3.65 ± 0.03 ^b	8.57 ± 0.28 ^b
Acide ascorbique	3.54 ± 0.01 ^b	8.42 ± 0.59 ^b

Une lettre différente indique une différence significative ($p < 0.001$) des valeurs correspondant aux extraits délipidés dans la même colonne. NS : différence non significative ($p > 0.05$) entre l'extrait brut (EBr) et l'extrait délipidé (ED) de chaque partie de la plante.

L'activité scavenger du radical DPPH[•] par les différents extraits de *H. cheirifolia* est probablement due à leur contenu en polyphénols. Cette activité est étroitement liée à leurs structures chimiques d'où la différence observée entre les différents extraits analysés. En effet, il est admis que l'effet antioxydant des substances naturelles envers les radicaux libres est particulièrement dépendant de la diversité et de l'hétérogénéité de leur structure chimique et de leur degré de polarité (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Kelly *et al.*, 2002).

Les groupes ortho-dihydroxyles sont particulièrement à l'origine du potentiel neutralisant les radicaux libres par les polyphénols. Cette réaction permet la formation de radicaux

phénoxyles (PhO ou FIO) à faible réactivité et de la forme stable du radical (RH). De plus, le radical phénoxy (FIO) redistribue son électron impair dans sa structure aromatique afin de réduire sa réactivité et aboutit à la formation d'un composé non réactif (FIO-R ou FIO-FIO) (Zheng *et al.*, 2010 ; Singh *et al.*, 2018). Par contre, le nombre et la position des groupes hydroxyle et méthoxyle, le degré de polymérisation et leur glycosylation, peuvent fortement affecter leur potentiel antioxydant. Il est aussi fort probable que ces biomolécules agissent par des mécanismes synergiques et/ou antagonistes (Molyneux, 2004 ; Zheng *et al.*, 2010 ; Bendary *et al.*, 2013). L'ensemble de ces facteurs peuvent expliquer la différence du potentiel anti-DPPH[•] observée entre les extraits de HC, où l'extrait ED-R, qualitativement, le plus riche en composés phénoliques a été le plus actif parmi les quatre extraits analysés.

Par ailleurs, une estimation de l'index d'efficacité anti-radicalaire (IEA), serait plus informative quant au potentiel des extraits envers le DPPH[•]. L'IEA est basé sur le pouvoir anti-radicalaire ($1/IC_{50}$) et le temps de la réaction ($T_{IC_{50}}$), calculé selon la formule suivante : $AE = 1/(EC_{50} \times T_{IC_{50}})$, (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998 ; Popovici *et al.*, 2009).

2.1.2. Effet scavenger du radical libre ABTS^{•+}

L'activité antioxydante des extraits bruts et délipidés des différentes parties de *Hertia cheirifolia* ainsi que celle de leurs fractions lipidiques, a été également déterminée par le suivi de la réduction du radical cationique ABTS^{•+}. Celle-ci est proportionnelle à la disparition de la couleur bleu verte du réactif (ABTS) à 734 nm (Antolovich *et al.*, 2002 ; Moon et Shibamoto, 2009). Comme le test du DPPH, cet essai met en jeu le transfert d'un atome d'hydrogène (HAT) et/ou le transfert d'un électron non apparié (SET). La capacité antioxydante des différents extraits analysés envers le radical ABTS^{•+}, exprimée en terme de Capacité Antioxydante en Trolox Equivalent (TEAC) en mmol. TE/g d'extrait (Re *et al.*, 1999), est évaluée par extrapolation des valeurs obtenues à partir de la gamme étalon réalisée au Trolox (**Annexe 5**). Les résultats obtenus montrent que tous les extraits de *Hertia*

cheirifolia exercent une activité antioxydante efficace du radical cationique ABTS^{•+} (25-80 % à 40-200 µg/mL respectivement). (Figure 18).

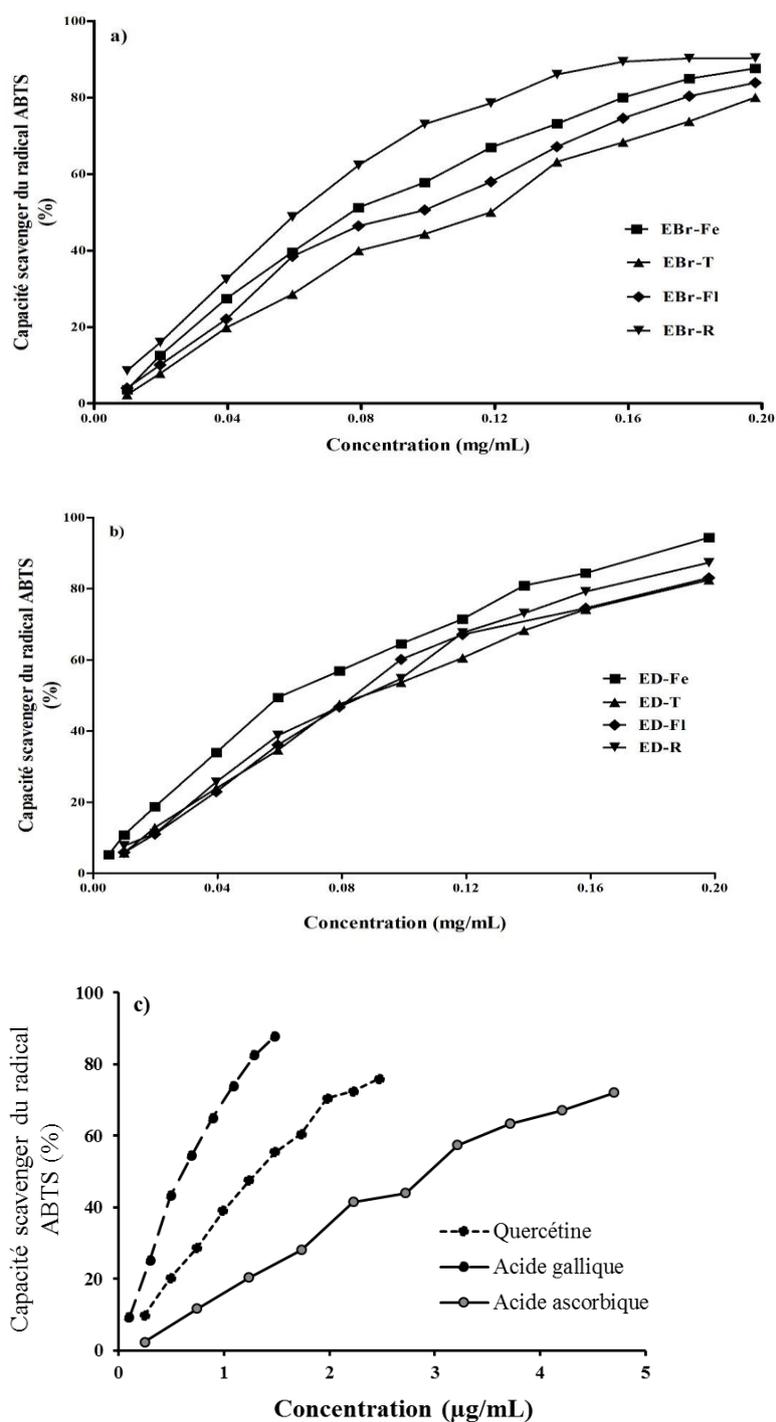


Figure 18. Activité neutralisant le radical libre ABTS^{•+} en fonction de la concentration des extraits méthanoliques de *Hertia cheirifolia*. **a)** Extraits bruts (EBr). **b)** Extraits délipidés (ED). **c)** Standards. (Fe : feuilles, T : tiges, Fl : fleurs, R : racines).

Parmi les extraits analysés, l'extrait ED-Fe a montré une activité significativement ($p < 0.001$) plus élevée en TEAC (0.174 ± 0.014 mmol TE/g) par rapport aux trois autres extraits, suivie de l'extrait ED-R (0.120 ± 0.017 mmol TE/g), significativement supérieure ($p < 0.05$) à l'extrait ED-Fl (0.081 ± 0.021 mmol TE/g) et à l'extrait ED-T ($0,078 \pm 0,022$ mmol TE/g), (**Figure 19**). Les résultats exprimés en TEAC ne montrent aucune différence significative entre les extraits bruts et délipidés. Les fractions lipidiques des différents extraits analysés, n'ont également montré aucune activité neutralisant le radical ABTS^{•+}. Par ailleurs, les valeurs en TEAC obtenues pour les standards sont plus importantes pour la quercétine et l'acide ascorbique (20.91 ± 2.91 mmol TE/g et 20.81 ± 1.8 mmol TE/g respectivement) suivis de l'acide gallique (8.95 ± 2.5 mmol TE/g).

La concentration nécessaire à inhiber l'oxydation de 50% du réactif de l'ABTS (IC₅₀), a été calculée à partir d'une série de concentrations croissantes (mg/mL) de chaque extrait. Chaque extrait délipidé a montré une IC₅₀ significativement supérieure ($p < 0.01$) à celle exercée par l'extrait brut correspondant (**Figure 20.a**).

Sachant que la valeur la plus faible en IC₅₀ correspond à l'effet antioxydant le plus fort, l'extrait ED-Fe présente la capacité antioxydante la plus élevée envers le radical ABTS^{•+} (76.48 ± 0.58 µg/mL). Cette valeur est significativement supérieure ($p < 0.001$) à celles obtenues pour le reste des extraits. De plus, la valeur de l'IC₅₀ exercée par l'extrait ED-R (92.4 ± 0.39 µg/mL) est significativement plus élevée ($p < 0.05$) que celles obtenues par les extraits ED-Fl et ED-T (97.48 ± 0.75 µg/mL et 95.97 ± 1.73 µg/mL, respectivement), (**Figure 20.b**). Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus en TEAC. Les résultats des standards utilisés ont montré une IC₅₀ plus importante avec l'acide gallique (0.68 ± 0.004 µg/mL), suivi de la quercétine (1.40 ± 0.02 µg/mL) puis de l'acide ascorbique (3.02 ± 0.13 µg/mL).

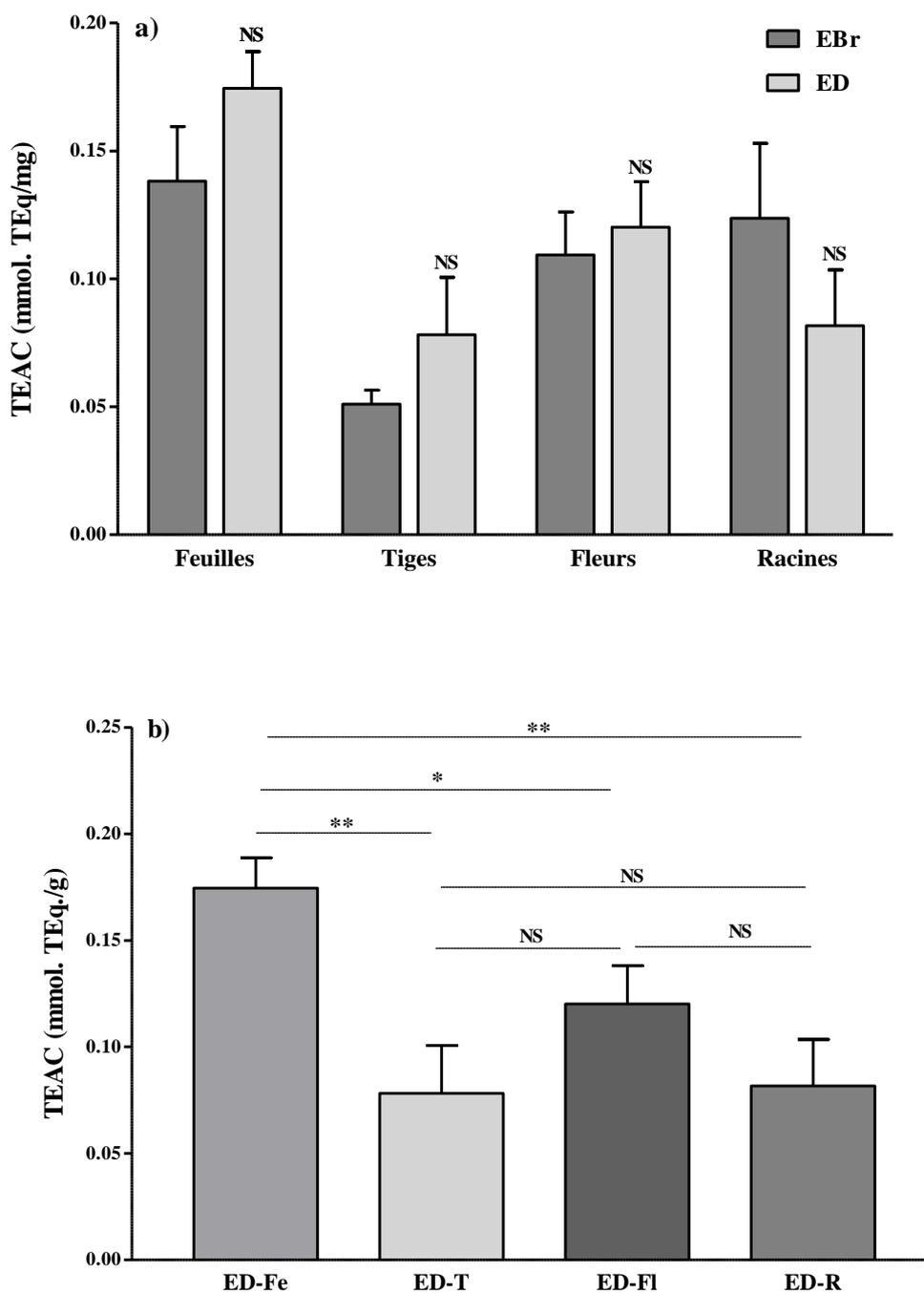


Figure 19. Capacité antioxydante en TEAC des extraits méthanoliques de *Hertia cheirifolia* envers le radical libre ABTS^{•+}. **a)** Extraits bruts (EBr). **b)** Extraits délipés (ED). -Fe : feuilles ; -T : tiges ; -Fl : fleurs ; -R : racines. (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$).

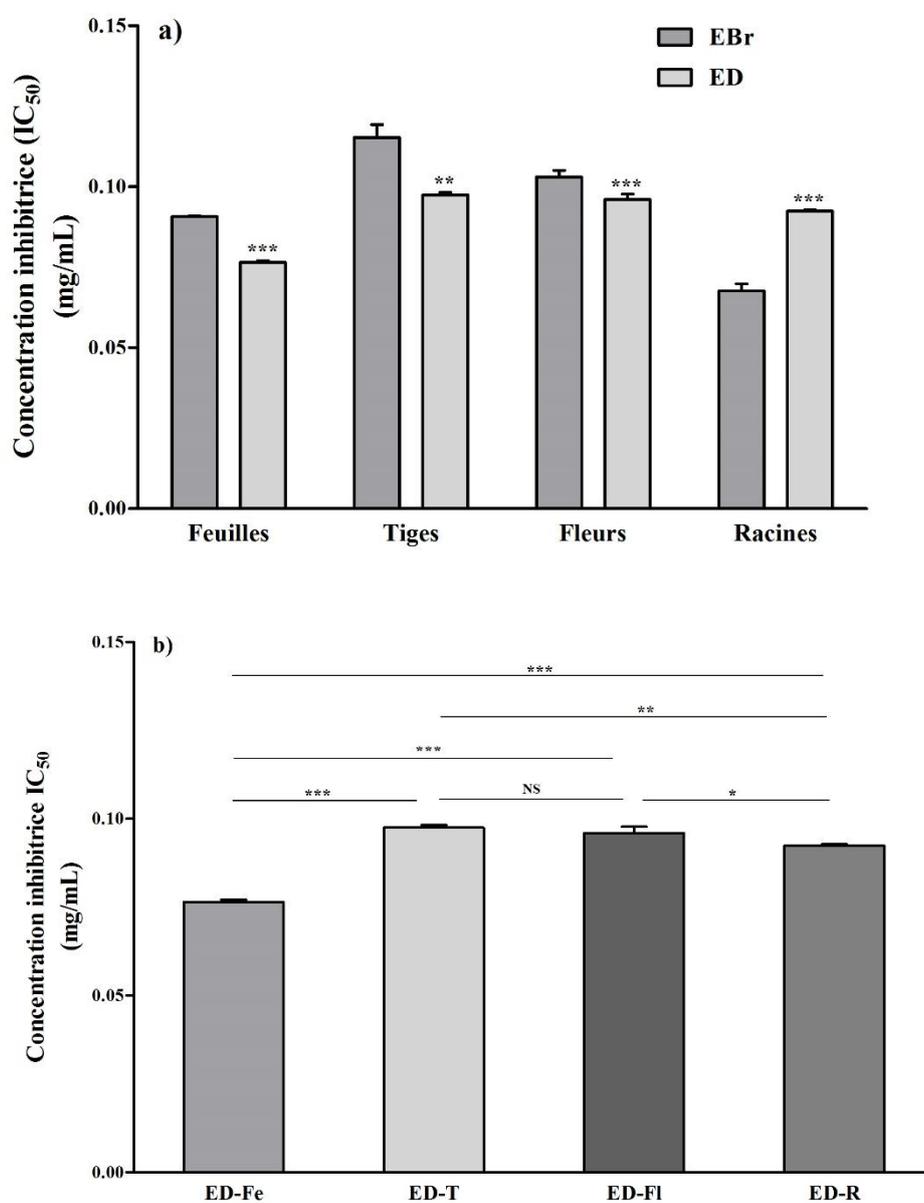


Figure 20. Concentrations inhibitrices (IC₅₀) de l'oxydation du radical libre ABTS^{•+} par les extraits méthanoliques de *Hertia cheirifolia*. **a)** Extraits bruts (EBr). **b)** Extraits délipidés (ED). Fe : feuilles ; T : tiges ; Fl : fleurs ; R : racines. (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

L'ensemble de ces résultats révèle une corrélation positive entre les valeurs de l'activité scavenger du radical $ABTS^{•+}$ exprimées en TEAC et le contenu en polyphénols et en flavonoïdes des quatre extraits analysés ($r = 0.9628$ et $r = 0.9221$, respectivement, $p < 0.05$). Les valeurs des IC_{50} envers le radical cationique $ABTS^{•+}$, montrent une corrélation négative avec le contenu en polyphénols et en flavonoïdes dans tous les extraits ($r = -0.9562$, $p < 0.05$; $r = -0.9910$, $p < 0.01$ respectivement), (**Annexe 4**).

Le radical libre cationique $ABTS^{•+}$ est habituellement réduit par les antioxydants en sa forme non radicalaire, d'où sa neutralisation *via* le transfert d'un électron non apparié et/ou le transfert d'un atome d'hydrogène (Huang *et al.*, 2005 ; Charles, 2013). Il a été démontré que les polyphénols sont des antioxydants potentiels grâce à leurs groupements conjugués et hydroxyle capables d'inhiber la génération de radicaux libres et de désactiver leurs précurseurs actifs (Rice-Evans *et al.*, 1996 ; Pietta, 2000). Les résultats de la présente étude montrent que l'activité anti- $ABTS$ de chacun des extraits analysés est directement liée à leur contenu en polyphénols. L'extrait ED-Fe, le plus riche en composés phénoliques, a présenté la capacité antioxydante la plus importante envers le radical $ABTS^{•+}$ (TEAC/ IC_{50}). Les autres extraits semblent exercer des capacités plus ou moins équivalentes, ce qui serait dû à la diversité de leur contenu en polyphénols, notamment les extraits ED-R et ED-Fl.

2.2. Pouvoir antioxydant réducteur du fer

Le test du pouvoir antioxydant réducteur du fer (FRAP) est réalisé en conditions acides, où le complexe triptidyltriazine ferrique (Fe^{3+} -TPTZ) est réduit en triptidyltriazine ferreux (Fe^{2+} -TPTZ) de couleur bleue par un antioxydant. C'est un test rapide et fiable permettant d'évaluer le pouvoir réducteur de fer dans les liquides biologiques, les aliments et les extraits de plantes (Antolovich *et al.*, 2001 ; Moon et Shibamoto, 2009).

L'effet antioxydant des différents extraits de *Hertia cheirifolia* et de leurs fractions lipidiques est mesuré au spectrophotomètre par le suivi de la formation du complexe TPTZ-Fe²⁺ à 593 nm. Le pouvoir antioxydant réducteur du fer de chaque extrait analysé est calculé par extrapolation à partir de la droite standard réalisée à des concentrations croissantes d'une solution de FeSO₄, 7H₂O en mmol équivalent de Fe²⁺/g d'extrait (**Annexe 5**).

Les résultats obtenus montrent que les quatre extraits délipidés ED-Fe, ED-T, ED-Fl et ED-R possèdent un pouvoir réducteur du fer significativement supérieur ($p < 0.001$) à celui exercé par l'extrait brut correspondant (**Figure 21**). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les lipides interfèreraient dans l'action réductrice des polyphénols. L'oxydation de la fraction lipidique est favorisée notamment à faible pH (Kim et Choe, 2018), par les ions ferreux dans le milieu réactionnel d'où un effet réducteur moindre par les extraits bruts. Par ailleurs, les fractions lipidiques de chaque extrait n'ont montré aucun effet antioxydant réducteur du fer.

Parmi les standards utilisés dans ce test, l'acide gallique présente le pouvoir antioxydant réducteur du fer le plus important suivi de la quercétine puis de l'acide ascorbique ($60.19 \pm 0.35 > 48.64 \pm 0.17 > 29.47 \pm 0.42$ mmol. Fe²⁺/g).

Les résultats obtenus pour les extraits délipidés (**Figure 21**), montrent que l'extrait ED-Fe possède le meilleur pouvoir réducteur du fer, suivi de l'extrait ED-R, puis ED-Fl et enfin ED-T (0.307 ± 0.003 ; 0.224 ± 0.003 ; 0.197 ± 0.003 ; 0.147 ± 0.004 mmol.Fe²⁺/g, respectivement). Une différence significative ($p < 0.001$) est notée entre les différents extraits délipidés. Ces résultats corroborent ceux obtenus par l'essai à l'ABTS^{•+} et sont en corrélation positive avec les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes ($r = 0.9569$ et $r = 0.9347$, respectivement, $p < 0.05$), (**Annexe 6**).

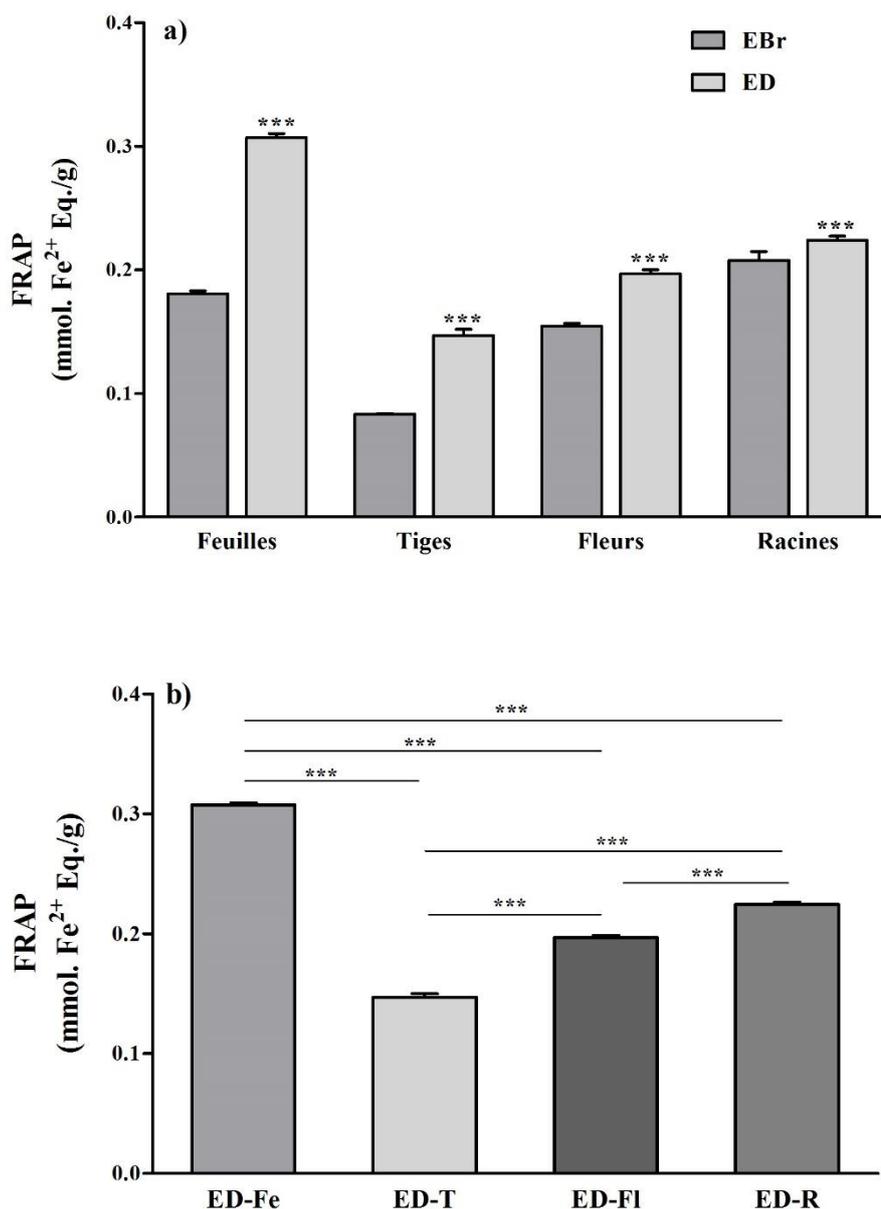


Figure 21. Potentiel antioxydant réducteur du fer (FRAP) des extraits méthanoliques de *Hertia cheirifolia*. **a)** Extraits bruts (EBr) versus extraits délipidés. **b)** Extraits délipidés (ED). (***) : $p < 0.001$).

La propriété antioxydante des polyphénols liée à leur pouvoir chélateur de métaux (Fe²⁺) est basée sur le fait que les ions Fe²⁺/Cu²⁺ interviennent comme cofacteurs dans les réactions de formations des radicaux libres prévenant ainsi l'oxydation des molécules biologiques potentiellement causée par les radicaux libres (Perron et Brumaghim, 2009 ; Singh *et al.*,

2018). Il apparaît donc que le potentiel antioxydant réducteur du fer exercé par les différents extraits de *Hertia cheirifolia* serait lié à leur contenu en polyphénols.

Le fer et le cuivre, sont des bio-métaux redox-actifs contributeurs majeurs à la formation des ERO/ERA dans les systèmes biologiques. Le fer est le plus important des catalyseurs intervenant dans la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) aboutissant à la génération du radical hydroxyle (réaction de Fenton). Un radical fortement impliqué dans les dommages des biomolécules (Valko *et al.*, 2006 ; Prousek, 2007 ; Bokare et Choi, 2014).

Les chélateurs des ions métalliques de transition agissent par séquestration de ces métaux et contrôlent ainsi leur activité pro-oxydante. Des études récentes ont montré que les polyphénols peuvent être d'excellents chélateurs du fer et du cuivre (Fe^{2+}/Fe^{3+} et Cu^+/Cu^{2+}) (Ríha *et al.*, 2014 ; Liu et Guo, 2015). Cette propriété leur confère une activité antioxydante cytoprotectrice par blocage de la réaction de Fenton (Ferrai *et al.*, 1997 ; Mira *et al.*, 2002 ; Kim et Park, 2004).

Grâce à leurs groupes catéchol et pyrogallol, les polyphénols peuvent lier le fer *via* deux atomes d'oxygène. Des complexes Fe^{3+} -polyphénols, plus stables que Fe^{2+} -polyphénols, sont alors formés. En présence d'oxygène, les forme Fe^{2+} -polyphénols seront oxydées en la forme ferrique (Fe^{3+}), qui va inhiber la réaction de génération du radical OH^{\bullet} (Perron et Brumaghim, 2009 ; Perron *et al.*, 2010). Mira *et al.* (2002) ont montré que la capacité chélatrice des flavonoïdes est dépendante de la structure du flavonoïde, de l'ion métallique en question et du pH du milieu réactionnel. A cet effet, la présence de deux à trois doubles liaisons dans les flavones et les flavonols est essentielle à la chélation du cuivre grâce à la géométrie plane de sa structure chimique (Riha *et al.*, 2014 ; Liu et Guo, 2015).

2.3. Activité inhibitrice du blanchissement de la β -carotène/acide linoléique

Le test du blanchissement de la β -carotène en émulsion avec l'acide linoléique, est une méthode basée sur l'oxydation de l'acide linoléique, acide gras insaturé, en présence de la β -carotène dans l'eau (Moon et Shibamoto, 2009 ; Nur Alam *et al.*, 2013). Des radicaux libres peroxy (LOO^{\bullet}) sont formés et initient l'oxydation de la β -carotène déclenchant ainsi sa décoloration (Tsuchihashi *et al.*, 1995 ; Nur Alam *et al.*, 2013). En présence de substances antioxydantes, un ralentissement de cette décoloration mesurée à 470 nm est observé. L'activité inhibitrice du blanchissement est calculée par comparaison au contrôle négatif (sans extrait ou antioxydant) (Nur Alam *et al.*, 2013).

Pour analyser l'activité antioxydante inhibitrice du blanchissement de la β -carotène exercée par les différents extraits de *Hertia cheirifolia*, l'hydroxytoluène butylé (BHT) est utilisé comme standard et le méthanol a servi de blanc. La progression de l'activité inhibitrice des différents extraits en fonction du temps est enregistrée chaque 15 min pendant 120 min à 50°C.

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits analysés ainsi que leurs fractions lipidiques sont capables d'inhiber le blanchissement de la β -carotène. Cette activité est supérieure à 60% après 1 heure d'incubation et atteint 50%, à la fin de l'incubation pour la plupart des extraits analysés (**Figure 22**). Ainsi, une corrélation négative a été retrouvée entre le CTP et CTF et l'activité inhibitrice du blanchissement de la β -carotène ($r = - 0,8405$ et $r = - 0,8798$ respectivement, $p > 0.05$) exercée par les différents extraits analysés (**Annexe 6**).

Par ailleurs, les fractions lipidiques ont montré un effet relativement plus faible, à l'exception de la fraction Hex-Fe qui a présenté une activité inhibitrice de 40%. Cette activité est probablement liée à la nature des acides gras (saturés/insaturés) constituant cette fraction.

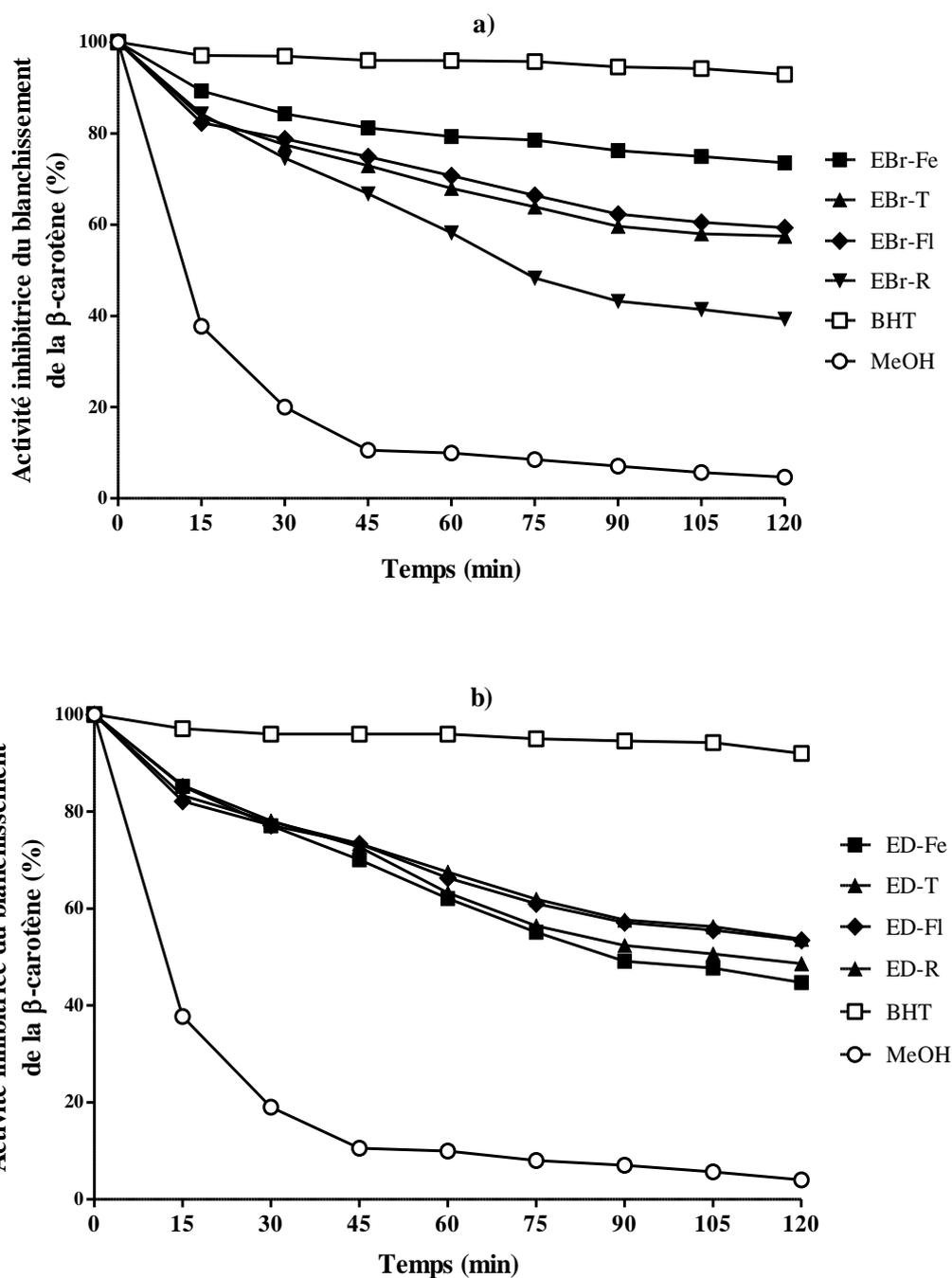


Figure 22. Cinétique de l'inhibition du blanchissement de la β -carotène par les différents extraits méthanoliques de *Hertia cheirifolia*. **a)** Extraits bruts (EBr). **b)** Extraits délipidés (ED). Fe : feuilles ; T : tiges ; Fl : fleurs ; R : racines ; BHT : hydroxytoluène butylé ; MeOH : méthanol.

Le BHT, antioxydant synthétique, a montré l'activité la plus élevée et la plus stable par rapport aux extraits et aux fractions testés, durant toute la période de l'incubation. Tandis que, l'activité inhibitrice en absence d'extraits (méthanol seul), a révélé un déclin rapide à une valeur de 10% après 60 min et seulement 5% à la fin de l'essai. Ces résultats sont en faveur d'une capacité inhibitrice du blanchissement de la β -carotène par tous les extraits de *Hertia cheirifolia*.

Aucune différence significative n'a été observée entre les extraits bruts et délipidés des tiges, des fleurs et des racines. Tandis qu'une différence significative ($p < 0.001$) a été notée entre EBr-Fe et ED-Fe ($73.56 \pm 5.89 \%$ vs $44.72 \pm 4.04 \%$), (**Figure 23**). Cette différence serait due au contenu lipidique important dans l'extrait de feuilles (16%). Ces lipides joueraient un rôle protecteur de l'oxydation de la β -carotène en émulsion avec l'acide linoléique d'où un ralentissement du blanchissement entre la première et la seconde heure d'incubation ($79.31 \pm 5.24\%$ vs $73.56 \pm 5.89 \%$). L'ensemble de ces résultats est en accord avec ceux obtenus par les études antérieures (Bousselsela *et al.*, 2012 ; Kada *et al.*, 2016).

L'essai du blanchissement de la β -carotène permet l'investigation des étapes précoces de la peroxydation lipidique. C'est un processus affectant les doubles liaisons soit par clivage donnant naissance à des produits caractéristiques, carbonyles ou époxydes ; soit par addition d'un groupe fonctionnel à l'une des deux liaisons (Moon et Shibamoto, 2009). Trois mécanismes sont à l'origine de l'attaque radicalaire contre les caroténoïdes ; addition de radicaux, transfert d'électrons au radical ou soustraction d'hydrogène allylique (Krinsky et Johnson, 2005).

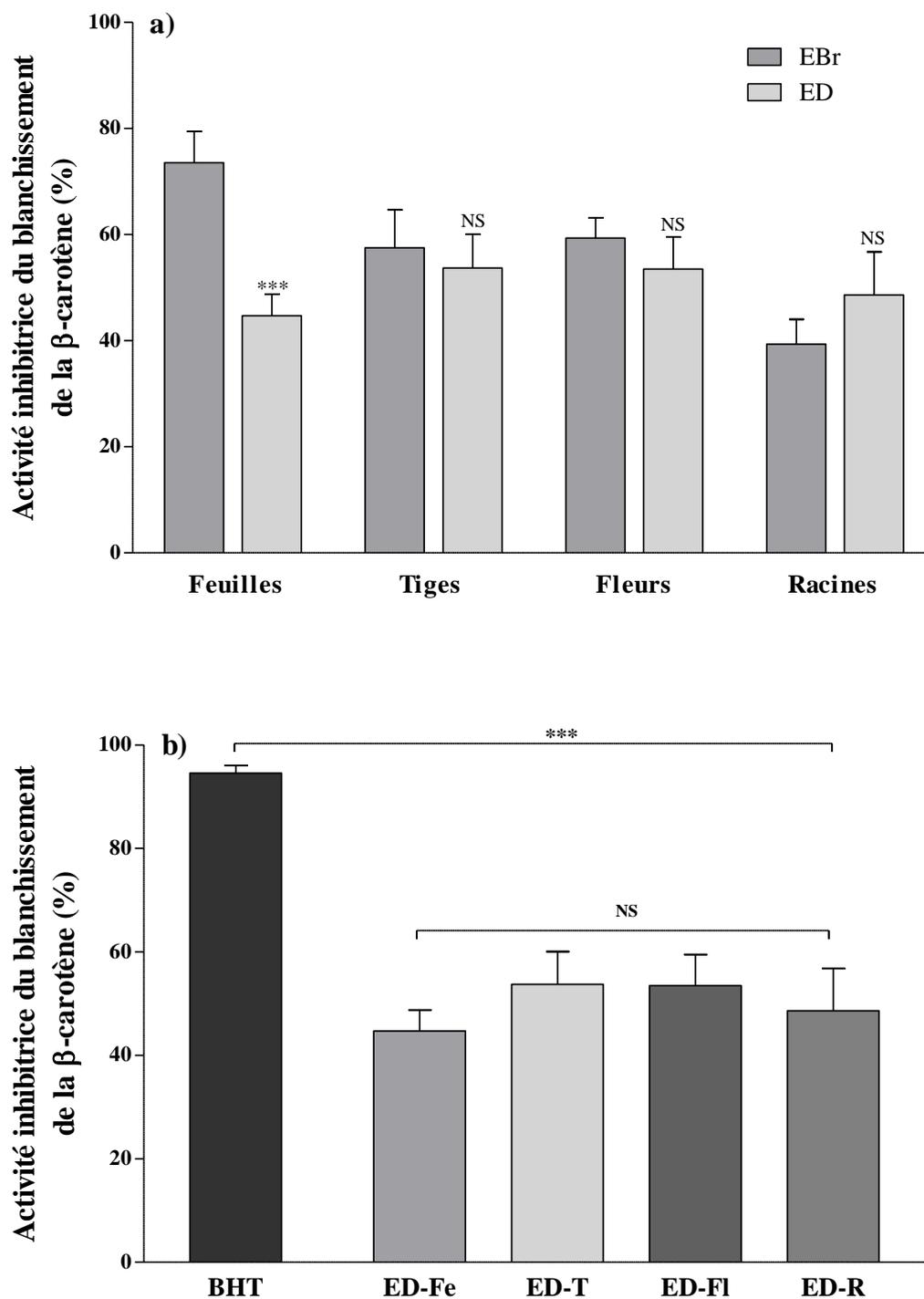


Figure 23. Capacité inhibitrice du blanchissement de la β -carotène par les extraits méthanoliques de *Hertia cheirifolia*. **a)** Extraits bruts (EBr) et délipidés (ED). **b)** Standard (BHT) et extraits délipidés (ED). Fe : feuilles ; T : tiges ; FI : fleurs ; R : racines. (NS : non significatif ; *** : $p < 0.001$).

En situation de peroxydation lipidique, les antioxydants cèdent un atome d'hydrogène aux radicaux peroxyde (LOO[•]) pour former des hydro-péroxydes, interrompant ainsi la chaîne de propagation radicalaire (Chaillou et Nazareno, 2006).

Grâce à leurs différents groupes substitués sur leurs noyaux aromatiques, les tocophérols et les composés phénoliques sont considérés comme meilleurs antioxydants naturels (Dangles, 2012). Leur capacité à céder un atome d'hydrogène est liée à l'énergie de dissociation de la liaison OH. De plus, un positionnement favorable (bonne mobilité vers le site de formation des (LOO[•])) est un facteur favorisant l'activité antioxydante des polyphénols (Krinsky et Johnson, 2005 ; Dangles, 2012).

3. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTI-INFLAMMATOIRE *IN VIVO*

3.1. Effet sur l'œdème de l'oreille induit au PMA chez la souris

L'application topique du Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) chez la souris est un modèle bien établi, utilisé dans le but d'étudier l'activité anti-inflammatoire de différentes molécules *in vivo*. Nous avons utilisé ce modèle dans le but d'une première évaluation de l'activité anti-inflammatoire des différents extraits de *Hertia cheirifolia*. Une seule dose (500 mg/Kg) de chaque extrait a été testée et comparée au contrôle positif traité au diclofénac[®] (100 mg/Kg) et au groupe contrôle négatif n'ayant reçu aucun traitement.

Les résultats montrent que les extraits des différentes parties de *H. cheirifolia* exercent un effet anti-inflammatoire important. En effet, L'épaisseur de l'œdème a été significativement réduite ($p < 0.001$) chez les souris des groupes traités aux extraits ED-T, ED-R et ED-Fe par rapport au groupe non traité, où l'épaisseur a été deux à trois fois plus importante (**Figure 24.a**). Le groupe traité à l'extrait ED-Fl a également présenté une diminution significative ($p < 0.01$) de l'épaisseur de l'œdème par rapport au groupe N-traité.

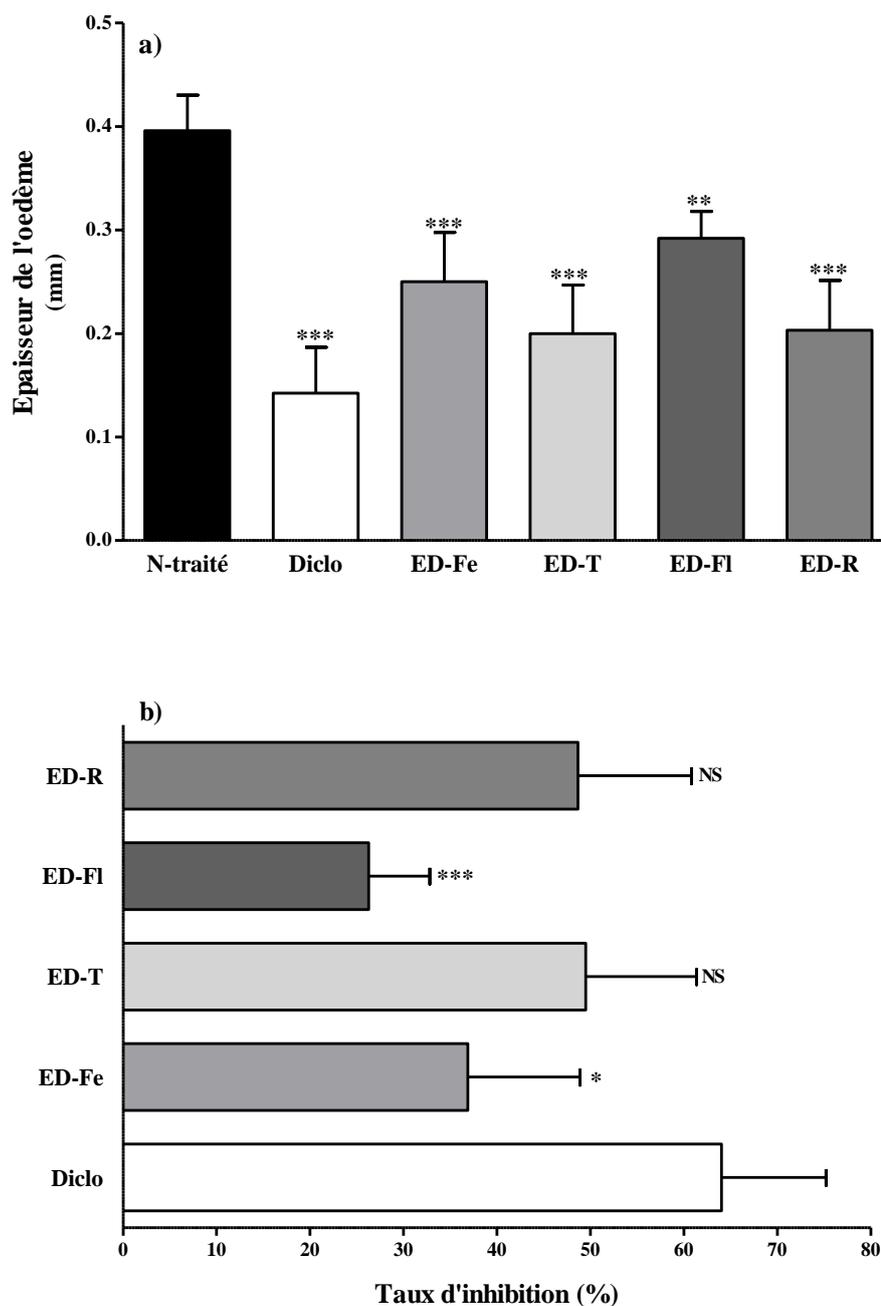


Figure 24. Activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques de *Hertia cheirifolia* dans le modèle de l'œdème de l'oreille induit au PMA. **a)** Epaisseur de l'œdème dans les différents groupes comparés au groupe non-traité. **b)** Taux d'inhibition de l'œdème par les différents extraits comparés au diclofénac. ED : extrait délipidé ; Fe : feuille ; T : tige ; Fl : fleur ; R : racines. (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

L'activité anti-inflammatoire du diclofénac® ainsi que celle des quatre extraits de HC, est exprimée par le taux d'inhibition de l'œdème dans chaque groupe. Les résultats obtenus montrent que le diclofénac® a permis une inhibition de l'œdème de $64.01 \pm 19.87\%$, tandis que des valeurs variables de l'activité inhibitrice de l'œdème ont été obtenues avec les différents extraits de *H. cheirifolia*. Les plus importantes ont été observées chez les groupes ED-T, ED-R et ED-Fe ($49,49 \pm 11.61\%$; $48,65 \pm 11.49\%$ et $36,86 \pm 7.02\%$ respectivement). L'extrait ED-Fl était relativement moins efficace ($26,26 \pm 2.33\%$), (**Figure 24.b**).

Aucune différence significative n'a été observée entre les extraits ED-T, ED-R en comparaison avec le diclofénac. Par ailleurs, l'activité anti-inflammatoire de l'extrait ED-Fe a été similaire à celle exercée par les extraits ED-R et ED-T. Il apparaît donc que les extraits méthanoliques des différentes parties de *H. cheirifolia* possèdent un potentiel anti-inflammatoire important probablement lié à leur contenu en composés phénoliques.

La différence de l'effet anti-inflammatoire entre les différents extraits pourrait être expliquée par la différence qualitative et quantitative de leur composition en polyphénols montrée notamment par les résultats de l'analyse par HPLC-DAD. En effet, l'activité importante exercée par les extraits ED-T et ED-R seraient probablement liée à cette diversité de composition pouvant mettre en jeu des effets synergiques entre les différentes molécules bioactives. Alors que l'extrait ED-Fe composé principalement de deux flavonoïdes majoritaires parmi les sept composés identifiés fait que son activité soit du même ordre que les extraits précédents.

Des effets antagonistes pourraient également avoir lieu entre les différentes molécules bioactives, ce qui pourrait expliquer le fait que l'extrait ED-Fl soit le moins actif bien que sa composition en polyphénols soit très proche de celle de l'extrait ED-R. Par ailleurs, une différence de métabolisme gastro-intestinal ainsi qu'une faible biodisponibilité de ces

molécules bioactives pourraient affecter le potentiel de leur activité (Rechner *et al.*, 2002; Monach *et al.*, 2004).

Le PMA est connu pour être promoteur de la protéine kinase C (PKC), capable d'induire la production de radicaux libres *in vivo*. Ainsi, les composés phénoliques connus pour leur action antioxydante pourraient agir grâce à leur effet neutralisant les ERO et/ou l'activation des voies antioxydantes (Eddouks *et al.*, 2012 ; Mishra *et al.*, 2013). Par ailleurs, il a été rapporté que les polyphénols et les flavonoïdes pourraient agir *in vivo* comme modulateurs des voies de signalisation des kinases permettant ainsi l'inhibition des voies pro-inflammatoires en faveur des voies anti-inflammatoires (Williams *et al.*, 2004 ; Zhou *et al.*, 2005). Ceci rend très évidente la relation entre une bonne consommation de composés phénoliques et la réduction du développement de maladies inflammatoires chroniques (Bravo, 1998 ; Mohamed, 2014 ; Hussain *et al.*, 2016).

3.2. Effet sur l'œdème de l'oreille induit à l'huile de croton chez la souris

L'œdème de l'oreille induit par application topique de l'huile de croton, est principalement provoqué par les esters de phorbol, connus pour leur effet irritant, tels que le principe actif 12-o-tétracanoilphorbol-13-acétate (TPA), (Stanley *et al.*, 1991 ; da Silva *et al.*, 2015). Comme le modèle au PMA, ce modèle est largement utilisé en recherche dans le but de tester l'activité anti-inflammatoire locale et systémique des anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) et non stéroïdiens (AINS). Il permet également d'évaluer l'activité anti-inflammatoire d'extraits végétaux et de nouveaux composés synthétiques (Sadeghi *et al.*, 2017 ; Oliveira-Tintino *et al.*, 2018).

Les résultats obtenus montrent que l'indométacine (25 mg/Kg) a exercé un effet anti-œdématogène significatif ($p < 0.001$), où l'épaisseur de l'œdème a été trois fois plus faible que celle observée chez le groupe contrôle négatif (0.042 ± 0.02 vs 0.113 ± 0.01 mm).

Les deux doses (200 et 400 mg/Kg) des quatre extraits testés ont également permis une réduction significative ($p < 0.001$) de l'épaisseur de l'œdème par rapport au groupe témoin (N-traité) (**Figure 25.a**).

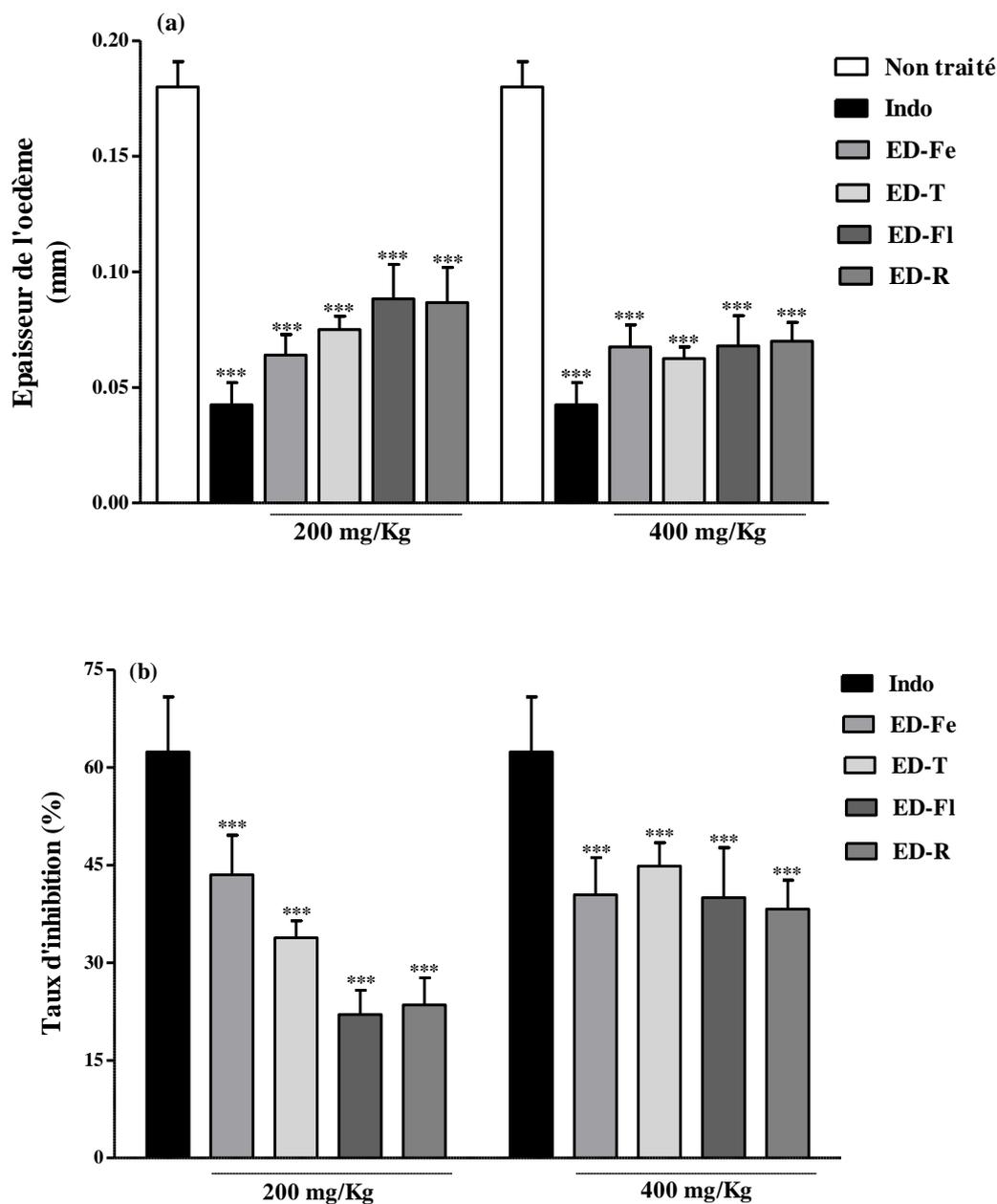


Figure 25. Activité anti-inflammatoire des extraits méthanoliques (200 et 400 mg/Kg) de *Hertia cheirifolia* dans le modèle de l'œdème de l'oreille induit à l'huile de croton. **a)** Epaisseur de l'œdème. **b)** Taux d'inhibition de l'œdème. Indo : Indométacine ; ED : extrait délipidé ; Fe : feuille ; T : tige ; Fl : fleur ; R : racines. (***) : $p < 0.001$).

L'analyse des résultats obtenus montre que les différents extraits de *H. cheirifolia* à 200 mg/Kg, ont montré que l'extrait ED-Fe possède l'effet le plus élevé, suivi de l'extrait ED-T ($p < 0.05$) puis des deux extraits ED-FI et ED-R ($p < 0.001$) ($43.52 \pm 6.08\%$; $33.82 \pm 2.6\%$; $23.52 \pm 4.14\%$; $22.05 \pm 3.7\%$), (**Figure 26.a**). De plus, l'effet inhibiteur de l'œdème pour chacun des extraits ED-FI, ED-R et ED-T a montré les valeurs suivantes à 200 et 400 mg/Kg respectivement ($22.05 \pm 3.7\%$ vs $40 \pm 7.66\%$; $23.52 \pm 4.14\%$ vs $38.23 \pm 4.45\%$ et $33.82 \pm 2.6\%$ vs $44.85 \pm 3.58\%$). Par contre, l'extrait ED-Fe a présenté des effets similaires à 200 et à 400 mg/Kg ($43.52 \pm 6.08\%$ vs $40.44 \pm 5.73\%$ respectivement). La comparaison de l'effet inhibiteur de l'œdème entre les quatre extraits à 400 mg/Kg, n'a révélé aucune différence significative (**Figure 26.b**).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que l'extrait ED-Fe soit le plus riche en composés phénoliques, suivi de l'extrait ED-T et enfin les extraits ED-FI et ED-R, ce qui est proportionnel aux résultats obtenus à 200 mg/Kg (ED-Fe > ED-T > ED-FI = ED-R). Néanmoins, les résultats observés à forte dose (400 mg/Kg), peuvent être expliqués par un effet antagoniste dans le cas de l'extrait ED-Fe, lié probablement aux composés minoritaires dans cet extrait. Par contre, un effet synergique serait à l'origine d'une meilleure activité des extraits ED-R et ED-FI à 400 mg/Kg, lesquels possèdent une composition plus diversifiée en polyphénols par rapport aux extraits ED-Fe et ED-T.

L'application topique de l'huile de croton déclenche une réponse inflammatoire stimulée par la libération de l'histamine et de la sérotonine, favorisant la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Patel et Gowda, 2012 ; Phanse *et al.*, 2012). De plus, l'huile de croton *via* l'effet pro-inflammatoire du TPA active la PKC, capable à son tour de déclencher d'autres cascades enzymatiques telles que MAPK et PLA2.

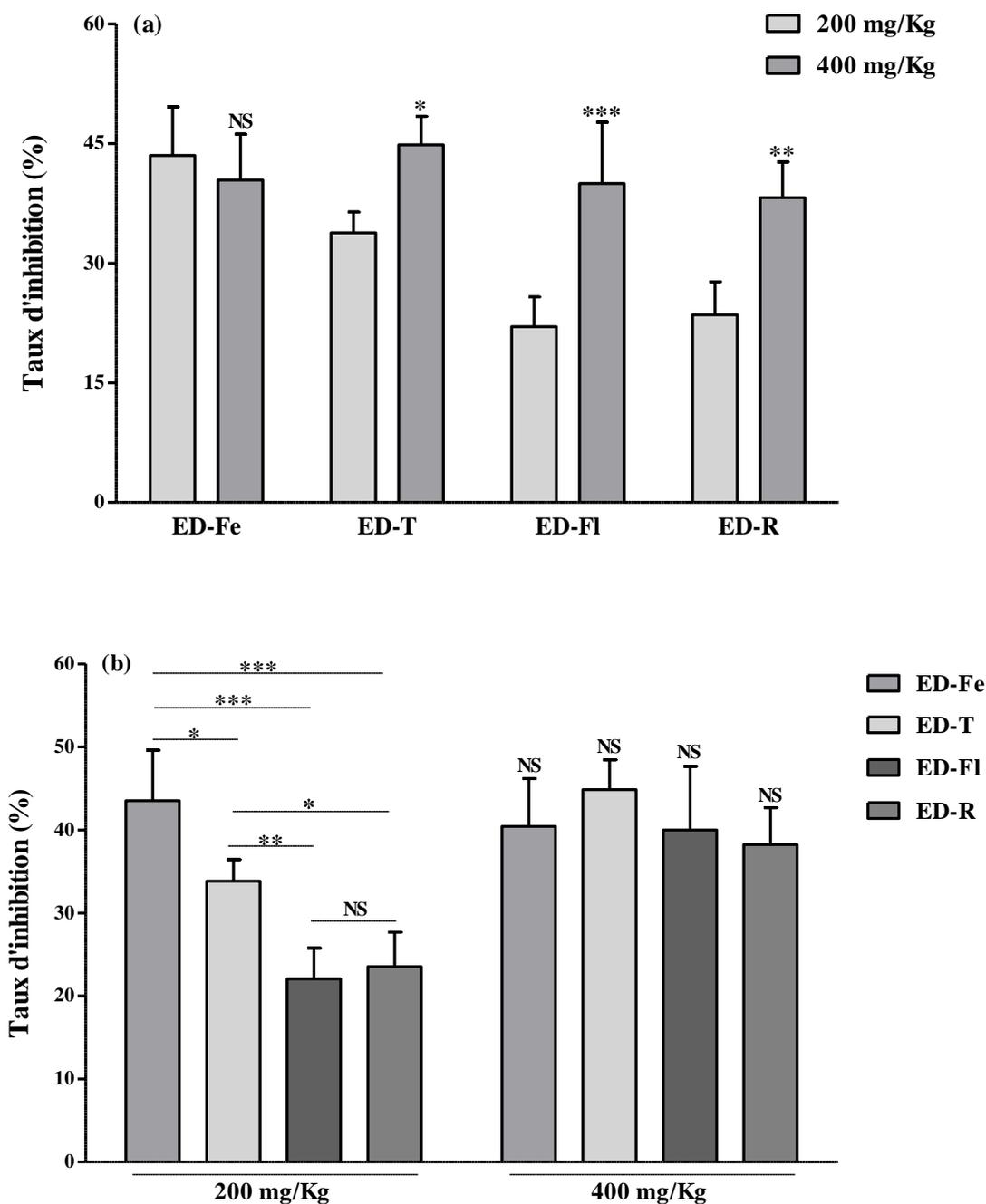


Figure 26. Taux d'inhibition de l'œdème induit à l'huile de croton par les extraits méthanoliques délipidés de *Hertia cheirifolia*. **a)** Effet de chaque extrait à 200 et 400 mg/Kg. **b)** Comparaison des différents extraits à 200 et à 400 mg/Kg. Indo : Indométacine ; ED : extrait délipidé ; Fe : feuille ; T : tige ; Fl : fleur ; R : racines. (NS : non significatif, * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

Cette série d'activation conduit à la libération du PAF et de l'acide arachidonique aboutissant à la formation des prostaglandines et des leukotriènes, responsables de la formation de l'œdème. A cet effet, les inhibiteurs des COX/LOX sont considérés comme inhibiteurs potentiels du processus inflammatoire induit par l'application de l'huile de croton (Passos *et al.*, 2013 ; Santos *et al.*, 2015 ; Karim *et al.*, 2019 ; Patil *et al.*, 2019). Ainsi, les différents extraits de *H. cheirifolia* testés, seraient directement ou indirectement impliqués dans l'inhibition du processus inflammatoire de ce modèle et constitueraient donc une source intéressante de molécules candidats à potentiel anti-inflammatoire *in vivo*.

3.3. Effet sur l'œdème de la patte induit à la carragénine chez le rat

La carragénine est un polysaccharide sulfaté issu d'algues rouges (Rhodophyceae), utilisé dans l'induction de l'œdème de la patte chez les rongeurs grâce à son effet phlébogène (Di Rosa, 1972 ; Nekas et Bartosikova, 2013). C'est un modèle particulièrement utile dans le criblage de nouvelles molécules anti-inflammatoires naturelles et synthétiques, *in vivo* (Winter *et al.*, 1962 ; Di Rosa *et al.*, 1971).

L'injection de la carragénine chez les rats du groupe non traité (N-Traité), a montré une augmentation rapide de l'épaisseur de la patte dès la première heure (1.39 ± 0.21 mm). Cette épaisseur a augmenté lentement jusqu'à la 3^{ème} heure (1.74 ± 0.06 mm), à partir de laquelle une élévation accélérée est observée jusqu'à la fin de l'expérimentation (2.65 ± 0.14 mm) (**Figure 28**). Cette évolution de la formation de l'œdème est typique à l'action de la carragénine, où un processus biphasique, comprenant une première phase précoce et une seconde phase tardive, est observé (Vinegar *et al.*, 1969).

La phase précoce est déclenchée immédiatement après l'injection de la carragénine (1-2 h), suite à la sécrétion de l'histamine et de la sérotonine. Elle est maintenue par une augmentation

de la perméabilité vasculaire grâce à la libération des kinines (2-3h). La seconde phase tardive et accélérée (3-6 h), marquée par un pic à 3h, est associée à la sécrétion des prostaglandines et du monoxyde d'azote issus de l'action des enzymes inductibles COX-2 et NOS-2, respectivement. Cette phase est accompagnée d'une migration leucocytaire (neutrophiles et macrophages) dans le site inflammatoire (Ryan et Majno, 1977 ; Patil et patil, 2017).

Le groupe contrôle positif, traité au diclofénac (25 mg/Kg) a montré un profil différent par rapport au groupe N-traité, où l'épaisseur de l'œdème a été dix fois plus faible dès la première heure (0.14 ± 0.01 mm vs 1.39 ± 0.21 mm). La courbe correspondant au groupe Dic révèle une diminution significative ($p < 0.001$) de l'épaisseur de l'œdème par rapport au groupe N-traité, tout au long des six heures (**Figure 27**). Néanmoins, deux valeurs pics ont été observées, trois et cinq heures après l'injection de la carragénine. Ces valeurs coïncident probablement avec le pic de production des médiateurs inflammatoires, où l'action du diclofénac a relativement diminué mais est restée efficace (**Figure 27**).

Les huit groupes expérimentaux traités par 200 et 400 mg/Kg, de chacun des extraits étudiés ont révélé une action différente. D'abord les deux doses des extraits ED-Fe et ED-T ont montré une évolution similaire de l'œdème au cours des six heures, où une diminution de l'épaisseur de l'œdème a été enregistrée dès la 1^{ère} heure (**Figure 27a/b**).

Par ailleurs, l'extrait ED-Fl semble être plus efficace à 200 mg/Kg, par rapport à la dose 400 mg/Kg. Celle-ci ne semble exercer aucun effet anti-inflammatoire 3-4h après injection de la carragénine par rapport au groupe N-traité (**Figure 27.c**). Pour les groupes ED-R 200 et ED-R 400, une augmentation de l'épaisseur de l'œdème a été également observée entre 2-4 heures par rapport au groupe N-traité (**Figure 27.d**).

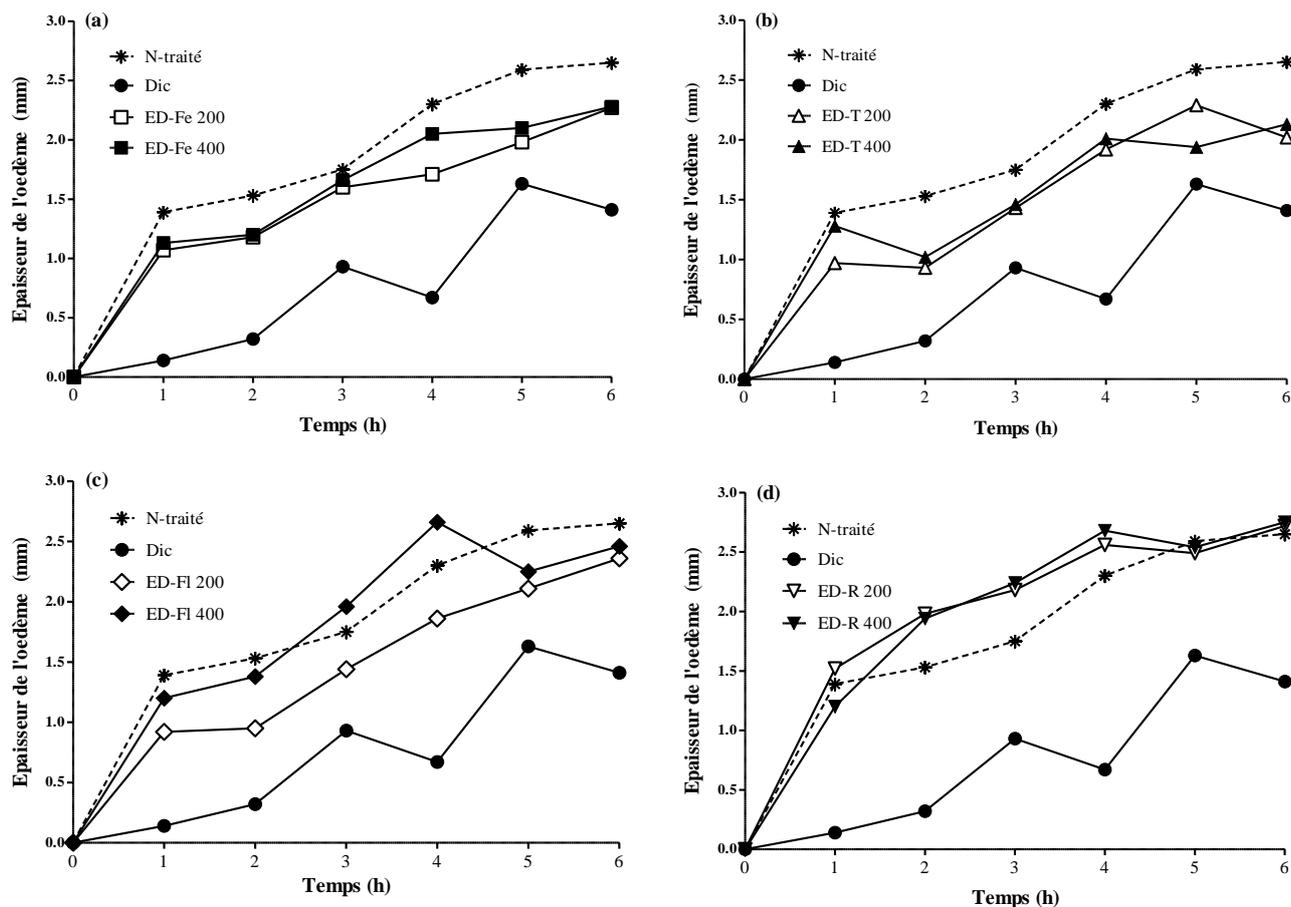


Figure 27. Effet des extraits méthanoliques délipidés(ED) de *Hertia cheirifolia* (200 et 400 mg/Kg) sur la cinétique de l'évolution de l'épaisseur de l'œdème induit à la carragénine chez le rat. **a)** Extrait de feuilles (Ed-Fe). **b)** Extrait de tiges (ED-T). **c)** Extrait de fleurs. **d)** Extrait de racines (ED-R). N-traité : contrôle négatif, non traité ; Dic : contrôle positif, traité au diclofénac (25 mg/Kg).

Afin de comparer l'effet anti-inflammatoire des différents extraits, l'épaisseur de l'œdème et le taux de l'effet inhibiteur de l'œdème exercé par le diclofénac et par chacun des extraits analysés ont été calculés et comparés pour chaque groupe, 3h et 5h après injection de la carragénine (Ammar *et al.*, 2009), (**Figures 28** et **29**).

Un effet positif des composés testés, lors de la première phase de la formation de l'œdème, révèle une activité antihistaminique et/ou anti-sérotonine. Tandis qu'une action pendant la

phase tardive est en faveur d'une action sur les prostaglandines, cible de la majorité des AINS (Okpo *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2014 ; George *et al.*, 2014).

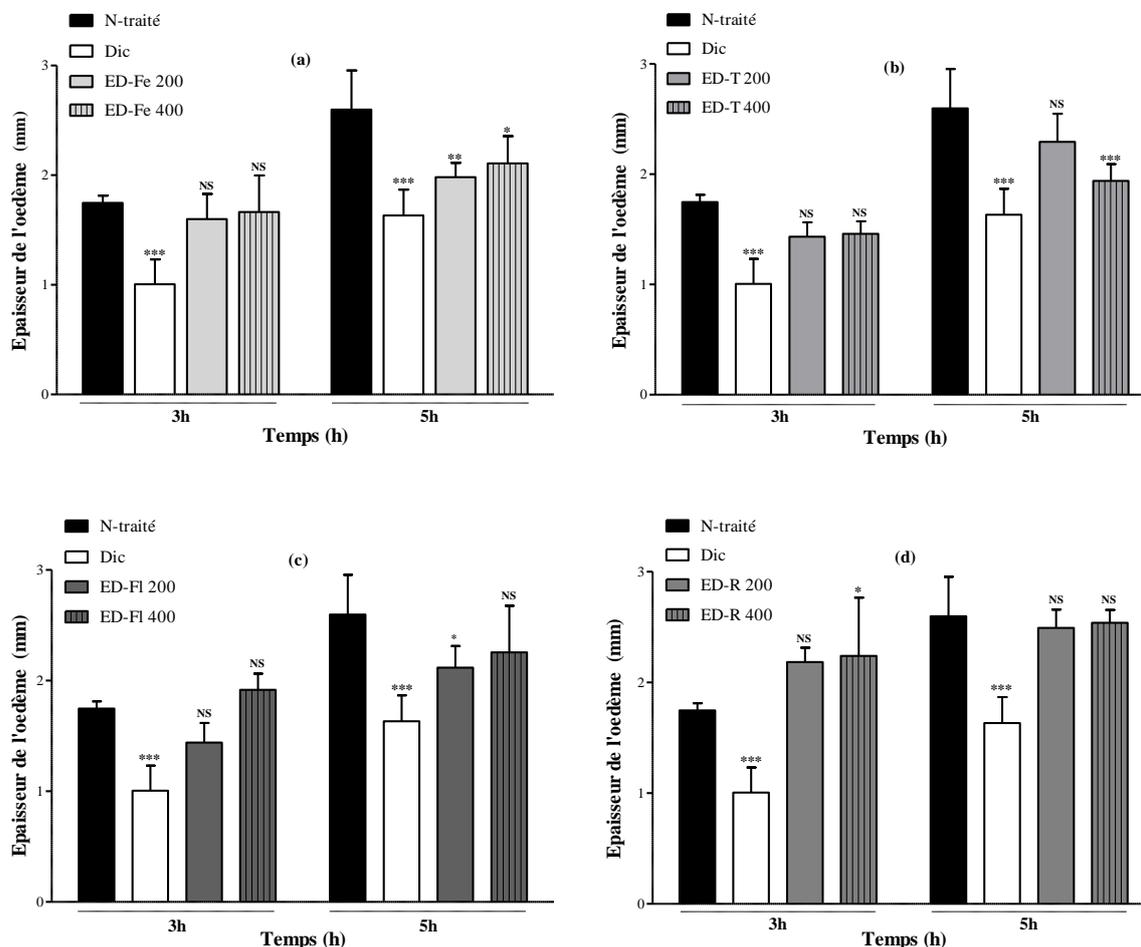


Figure 28. Epaisseur de l'œdème de la patte induit à la carragénine après traitement aux extraits méthanoliques délipidés (200 et 400 mg/Kg) de *Hertia cheirifolia*. (a) Extrait ED-Fe, (b) Extrait ED-T. (c) Extrait ED-FI. (d) Extrait ED-R. N-traité : non traité ; Dic : diclofénac ; ED : extrait délipidé ; Fe : feuille ; T : tige ; FI : fleur ; R : racines. (NS : non significatif, * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

Les résultats présentés dans la figure 29 montrent que le diclofénac (25 mg/Kg) a permis une réduction très significative ($p < 0.001$) de l'épaisseur de l'œdème par rapport au groupe non traité 3h et 5h après l'injection de la carragénine (1 ± 0.22 mm vs 1.74 ± 0.06 mm et 1.63 ± 0.23 vs 2.59 ± 0.35 mm, respectivement).

Par ailleurs, les différents extraits analysés (ED-Fe, ED-T, ED-FI et ED-R) à 200 et 400 mg/Kg, ne montrent aucune différence significative ($p > 0.05$) de l'épaisseur de l'œdème, après 3h de l'injection de la carragénine, par rapport au groupe N-traité (**Figure 28**). A l'exception de la dose 400 mg/Kg de l'extrait ED-R où une augmentation significative ($p < 0.05$) a été enregistrée par rapport au groupe N-traité (**Figure 28.c**).

Après 5h de l'injection de la carragénine, les deux doses testées de l'extrait ED-Fe, ont permis une réduction significative de l'épaisseur de l'œdème (1.98 ± 0.13 mm vs 2.59 ± 0.35 mm, $p < 0.01$ et 2.10 ± 0.24 mm vs 2.59 ± 0.35 mm, $p < 0.05$ respectivement), (**Figure 28.a**). Cependant, seule la dose 400 mg/Kg de l'extrait ED-T a permis une réduction significative ($p < 0.001$) de l'épaisseur de l'œdème (1.94 ± 0.15 mm vs 2.59 ± 0.35 mm) (**Figure 28.b**). Par ailleurs, l'extrait ED-FI à 200 mg/Kg a montré une réduction significative ($p < 0.05$) de l'épaisseur de l'œdème par rapport au groupe N-traité (2.11 ± 0.19 mm vs 2.59 ± 0.35 mm) alors qu'aucune différence de l'épaisseur de l'œdème n'a été observée entre les groupe ED-FI 400 et N-traité (2.25 ± 0.42 mm vs 2.59 ± 0.35 mm) (**Figure 28.c**). Enfin, aucun effet ($p > 0.05$) n'a été obtenu dans les groupes ED-R 200 et ED-R 400 par rapport au groupe N-traité (2.49 ± 0.16 mm vs 2.59 ± 0.35 mm ; 2.54 ± 0.11 mm vs 2.59 ± 0.35 mm respectivement), (**Figure 28.d**). La réduction de l'épaisseur de l'œdème obtenue dans chaque groupe expérimental est le résultat d'une activité anti-inflammatoire exercée par le diclofénac ou par l'un des extraits étudiés.

Les résultats obtenus montrent que le diclofénac possède une action anti-œdémogène importante et significativement différente ($p < 0.001$) de celle exercée par les différents extraits testés (**Figure 29**). Le taux d'inhibition de l'œdème exercé par le diclofénac 3h et 5h après injection de la carragénine est de $42.48 \pm 9.61\%$ et $37.11 \pm 8.7\%$ respectivement.

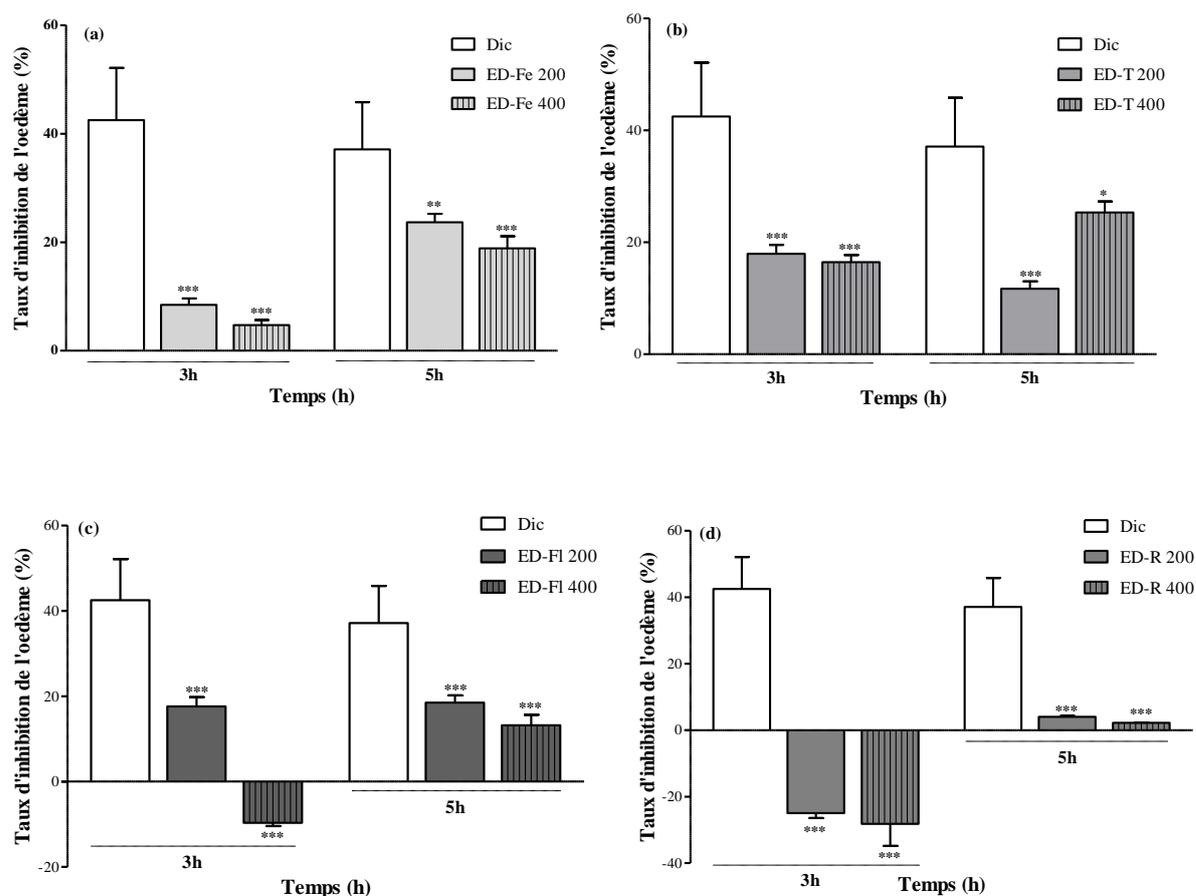


Figure 29. Taux d'inhibition de l'œdème par les différents extraits méthanoliques délipidés (200 et 400 mg/Kg) de *Hertia cheirifolia* dans le modèle de l'œdème de la patte induit à la carragénine chez le rat. (a) Extrait de feuilles (ED-Fe). (b) Extrait de tiges (ED-T). (c) Extrait de fleurs (ED-Fi). (d) Extrait de racines (ED-R). Dic : diclofénac (25 mg/Kg) ; ED : extrait délipidé (NS : non significatif ; *** : $p < 0.001$).

Le taux d'inhibition de l'œdème exercé par l'extrait ED-Fe en début de la phase active tardive semble être sans efficacité ($8.44 \pm 1.2\%$ à 200 mg/Kg et $18.86 \pm 2.22\%$ à 400 mg/Kg). Cette action a été plus efficace à 5h, où un effet inhibiteur significatif a été obtenu à 200 mg/Kg de ($23.67 \pm 1.55\%$, $p < 0.01$) et à 400 mg/Kg ($21.26 \pm 1.83\%$, $p < 0.05$), (**Figure 29.a**).

Le résultat obtenu par l'extrait ED-T n'a montré aucune efficacité dans la réduction de l'œdème à 3h ($17.93 \pm 1.61\%$ vs $16.45 \pm 1.26\%$ respectivement). Néanmoins, après 5h, un taux d'inhibition de $25.31 \pm 1.97\%$ a permis une réduction significative ($p < 0.001$) de l'œdème chez les rats du groupe ED-T 400, contrairement au groupe ED-T 200 ($11.7 \pm 1.29\%$), (**Figure 29.b**).

Par ailleurs, un effet inhibiteur de $18.47 \pm 1.7\%$ exercé par l'extrait ED-FI 200 a permis une réduction significative ($p < 0.05$) de l'œdème, 5h après l'injection de la carragénine. Alors qu'aucun effet significatif n'a été observé après 3h de l'injection de la carragénine ($17.59 \pm 2.16\%$). Dans le groupe ED-FI 400, aucun effet anti-œdématogène n'a été observé par rapport au groupe N-traité à 3h et à 5h après injection de la carragénine ($-9.68 \pm -0.74\%$ et $13.18 \pm 2.46\%$ respectivement), (**Figure 29.c**). De même pour les groupes ED-R 200 et ED-R 400, aucun effet anti-inflammatoire n'a été observé après 3h et 5h de l'injection de la carragénine. Le taux de l'inhibition de l'œdème par l'extrait ED-R 200 a été très faible à 3h et à 5h ($-24.97 \pm -1.48\%$ et $4.04 \pm 0.26\%$ respectivement). Pour la dose 400 mg/Kg un taux d'inhibition de $-28.18 \pm -6.62\%$ à 3h a montré une augmentation significative ($p < 0.05$) de l'épaisseur de l'œdème (**Figure 29.d**).

Plusieurs études ont rapporté que la seconde phase de la formation de l'œdème par injection de la carragénine est la cible de la plupart des drogues anti-inflammatoires. D'ailleurs, ce modèle est notamment sensible aux inhibiteurs des COX (AINS) impliqués dans la synthèse des prostaglandines et des LOX (Borhade *et al.*, 2012 ; Ilic *et al.*, 2014 ; George *et al.*, 2014).

L'action anti-inflammatoire des extraits testés de *H. cheirifolia*, bien que pas très prononcée, est probablement liée à leur contenu en polyphénols, largement reconnus pour leur propriété anti-inflammatoire. L'inhibition de l'inflammation par les composés phénoliques serait *via* l'inhibition de la synthèse, de la sécrétion ou de l'action des médiateurs inflammatoires (Su *et*

al., 2011 ; Eddouks *et al.*, 2012). D'autres médiateurs tels que l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et les protéases sont produits par l'infiltrat leucocytaire activé. De plus, le lysozyme et le système du complément sont souvent impliqués (Borhade *et al.*, 2012 ; Kandati *et al.*, 2012 ; Rathi *et al.*, 2013).

Les polyphénols sont particulièrement reconnus pour être des antioxydants naturels capables d'inhiber les ERO, grâce à leurs diverses propriétés biologiques dont la neutralisation des radicaux libres, la chélation des métaux et la prévention de la peroxydation lipidique. Néanmoins, différentes études ont montré que les polyphénols peuvent devenir pro-oxydants en conditions de concentrations élevées en ces composés et en présence d'ions redox-actifs (Fe et Cu) *via* des réactions pro-oxydantes (Babich *et al.*, 2011 ; Prochazkova *et al.*, 2011 ; Yordi *et al.*, 2012). De plus, un effet pro-oxydant conduisant à un taux cytotoxique en ERO est souvent observé en situation pathologique (inflammation, cancer), où les concentrations des métaux de transition sont plus élevées et l'activité métabolique cellulaire est plus importante qu'en situation normale (Ahmed *et al.*, 2012 ; Park et Pezzuto, 2012 ; Eghbaliferiz et Iranshahi, 2016). Ceci pourrait d'une part expliquer les résultats obtenus dans ce modèle induit à la carragénine, où en phase active (après 3h), le taux de médiateurs et cofacteurs inflammatoires serait à son optimum rendant ainsi l'action anti-inflammatoire des extraits, moins efficace. D'ailleurs, cette phase est marquée par une action relativement faible du diclofénac par rapport au restant de la période du test. Contrairement à l'application topique du PMA et de l'huile croton, l'injection intradermique de la carragénine serait inductrice d'une stimulation plus accentuées des cellules et des médiateurs inflammatoires.

D'autre part, l'activité pro-oxydante des polyphénols est étroitement liée à leurs structures. En effet, le nombre des groupes hydroxyles portés par les anneaux phénols affecte positivement le pouvoir pro-oxydant particulièrement en position ortho. Il a été prouvé que les polyphénols

ortho di/tri-hydroxyles (quercétine, myricétines) peuvent être à potentiel pro-oxydant plus important que les autres formes meta- et para-dihydroxy et mono-hydroxyles. Un nombre important d'acides phénoliques et de flavonoïdes dont l'acide caféique et la rutine sont dotés de cette dualité d'activité, anti- et pro-oxydante (Fukumoto et Mazza ; 2000).

4. ACTIVITE ANTI-ARTHRITE INDUITE A L'ADJUVANT COMPLET DE FREUND CHEZ LE RAT

Le modèle de l'AIA est un modèle expérimental largement validé et utilisé dans l'étude de la physiopathologie de l'AR ainsi que dans la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques à potentiel anti-inflammatoire (Ferraccioli *et al.*, 2010 ; Kelly et Genovese, 2013 ; Amraoui *et al.*, 2019). Ce modèle permet de mimer les symptômes observés au cours de l'AR humaine, tels que la formation de l'œdème au niveau de l'articulation, l'infiltration lymphocytaire et la dégradation du cartilage (Roy et Ghosh, 2013 ; Choudhary *et al.*, 2018).

4.1. Effet des extraits de *H. cheirifolia* sur les paramètres cliniques

4.1.1. Effet sur l'épaisseur de la patte

L'injection de l'ACF chez les rats des différents groupes expérimentaux a provoqué une augmentation rapide de l'épaisseur de la patte marquée par un maximum à J3, où un taux de gonflement de $127.43 \pm 7.18\%$ a été enregistré chez le groupe négatif (AIA) (4.84 ± 0.49 mm). Une légère baisse est observée jusqu'à J10 suivie de l'apparition d'un nouveau pic entre J14 et J21 ; à J17 un taux de gonflement de $108.22 \pm 15.64\%$ (4.11 ± 0.91 mm) a été observé. Une légère baisse est observée à nouveau vers la fin de l'étude à J28, avec un taux de gonflement de $80.52 \pm 5.16\%$ (3.06 ± 0.43 mm), (**Figure 30**).

La formation de l'œdème du modèle de l'AIA chez le rat est caractérisée par une apparition et une progression rapide de l'inflammation. Il s'agit d'une transition d'une première phase aiguë (jusqu'à J10) vers une seconde phase dite chronique allant de la 2^{ème} semaine (J14) jusqu'à la fin de la période expérimentale (J28), (Ferraccioli *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2015 ; Choudhary *et al.*, 2018).

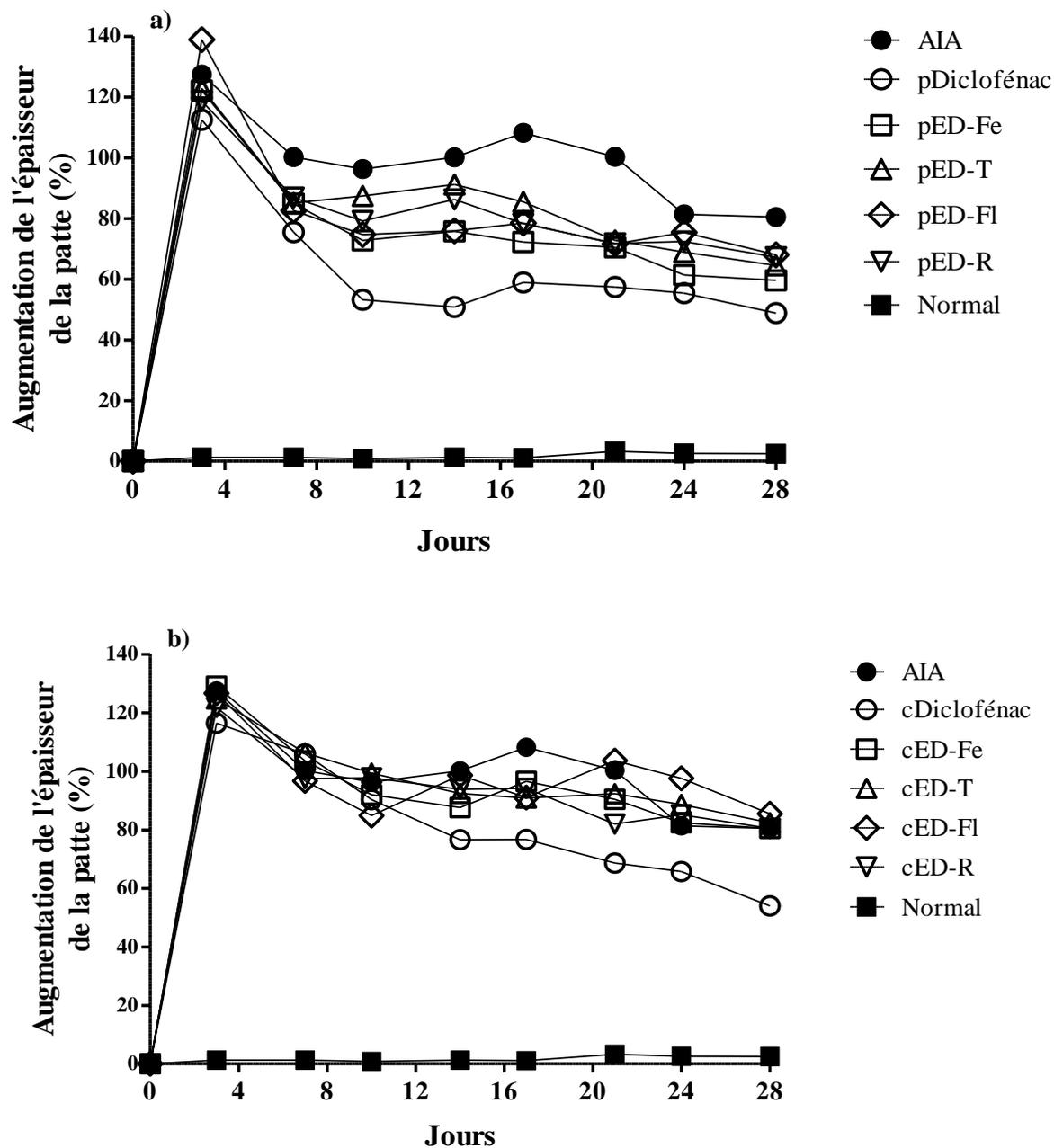


Figure 30. Taux du gonflement de la patte chez les rats avec AIA après administration des extraits méthanoliques délipidés de *Hertia cheirifolia*. **a)** Effet préventif. **b)** Effet curatif. AIA : groupe arthritique non traité, diclofénac : 3 mg/Kg, ED-Fe : extrait de feuilles, ED-T : extrait de tiges, ED-Fl : extrait de fleurs, ED-R : extrait de racines. p : préventif, c : curatif.

Dans la première partie de notre étude, les extraits de *H. cheirifolia* (200 mg/Kg) sont testés pour leur effet préventif sur le modèle de l'AIA chez le rat. Le diclofénac (3 mg/Kg) a été utilisé comme contrôle positif. Les différents traitements administrés à J0, une heure avant l'induction de l'AR ont révélé les résultats présentés dans la **figure 31.a**.

Les résultats obtenus montrent qu'une dose journalière de diclofénac (3 mg/Kg), a permis une baisse significative ($p < 0.001$) du taux du gonflement de la patte dès J3 par rapport au groupe non traité AIA ($97.57 \pm 6.56 \%$ vs $127.43 \pm 7.18\%$). Cet effet a été observé tout au long de l'étude et a permis une réduction significative ($p < 0.001$) du taux de gonflement de la patte à J28 par rapport au groupe AIA ($48.77 \pm 3.41\%$ vs $80.53 \pm 5.08\%$), (**Figure 31.a**).

Concernant les groupes ayant reçu 200 mg/Kg des différents extraits de *H. cheirifolia* en préventif (pED-Fe, pED-T, p-ED-Fl et p-ED-R), une nette amélioration de la progression de l'inflammation de la patte a été observée. En effet, une baisse significative ($p < 0.001$) du taux du gonflement de la patte a été enregistrée tout au long de la période de l'expérience. Le taux du gonflement de la patte a montré une nette baisse dans le groupe pED-Fe, suivi du groupe pED-T puis pED-R et enfin pED-Fl ($59.58 \pm 3.61 \% < 64.52 \pm 1.28 \% < 67.21 \pm 1.26 \% < 68 \pm 7.08\%$ respectivement), (**Figure 31.a**).

Le taux d'inhibition de l'œdème exercé par le diclofénac et par chacun des extraits de *H. cheirifolia* administrés en préventif, a été calculé à partir de l'épaisseur moyenne de l'œdème dans chaque groupe par rapport au groupe AIA. Un potentiel inhibiteur maximum a été obtenu avec le diclofénac ($39.54 \pm 8.53 \%$) suivi du ED-Fe ($26.14 \pm 4.24\%$) puis ED-T ($19.93 \pm 1.01 \%$) et enfin ED-R et ED-Fl avec un taux d'inhibition équivalent ($16.66 \pm 0.77\%$ et $15.68 \pm 4.04\%$ respectivement).

L'étude de l'effet curatif du diclofénac et des extraits de HC, administrés à partir de J13 chez les rats avec AIA a permis d'obtenir les résultats présentés dans la **figure 31.b**. Le diclofénac (3 mg/Kg), a montré une réduction significative ($p < 0.001$) du taux du gonflement de la patte par rapport au groupe AIA dès J14 ($76.58 \pm 3.32 \%$ vs $100.13 \pm 3.66 \%$). A la fin de l'expérimentation (J28), le taux du gonflement de la patte était significativement ($p < 0.001$) inférieur dans le groupe c-diclofénac par rapport au groupe AIA ($53.99 \pm 4.05 \%$ vs $80.53 \pm 5.16 \%$ respectivement). Le taux d'inhibition de l'œdème exercé par le diclofénac en traitement curatif est de $33 \pm 7.05 \%$.

Par ailleurs, aucun effet inhibiteur de l'œdème n'a été constaté dans les groupes ED-Fe, ED-T, ED-Fl et ED-R en traitement curatif, par rapport au groupe AIA. Aucune différence significative n'a été enregistrée pour le taux du gonflement ou l'épaisseur de l'œdème entre les groupes traités en curatif et le groupe AIA (**Figure 31.b**). Néanmoins, une légère amélioration de l'évolution de l'œdème a été observée entre J14 et J21 dans les différents groupes traités aux extraits de *H. cheirifolia* par rapport au groupe AIA. Une baisse du taux du gonflement de la patte d'au moins 10% a été enregistrée chez les rats des groupes ED-Fe, ED-T et ED-R. Cette baisse a été seulement observée à J17 dans le groupe ED-Fl (**Figure 30.b**). Ces résultats attestent d'un effet protecteur des extraits administrés en curatif contre l'exacerbation de l'inflammation articulaire chez le rat avec AIA.

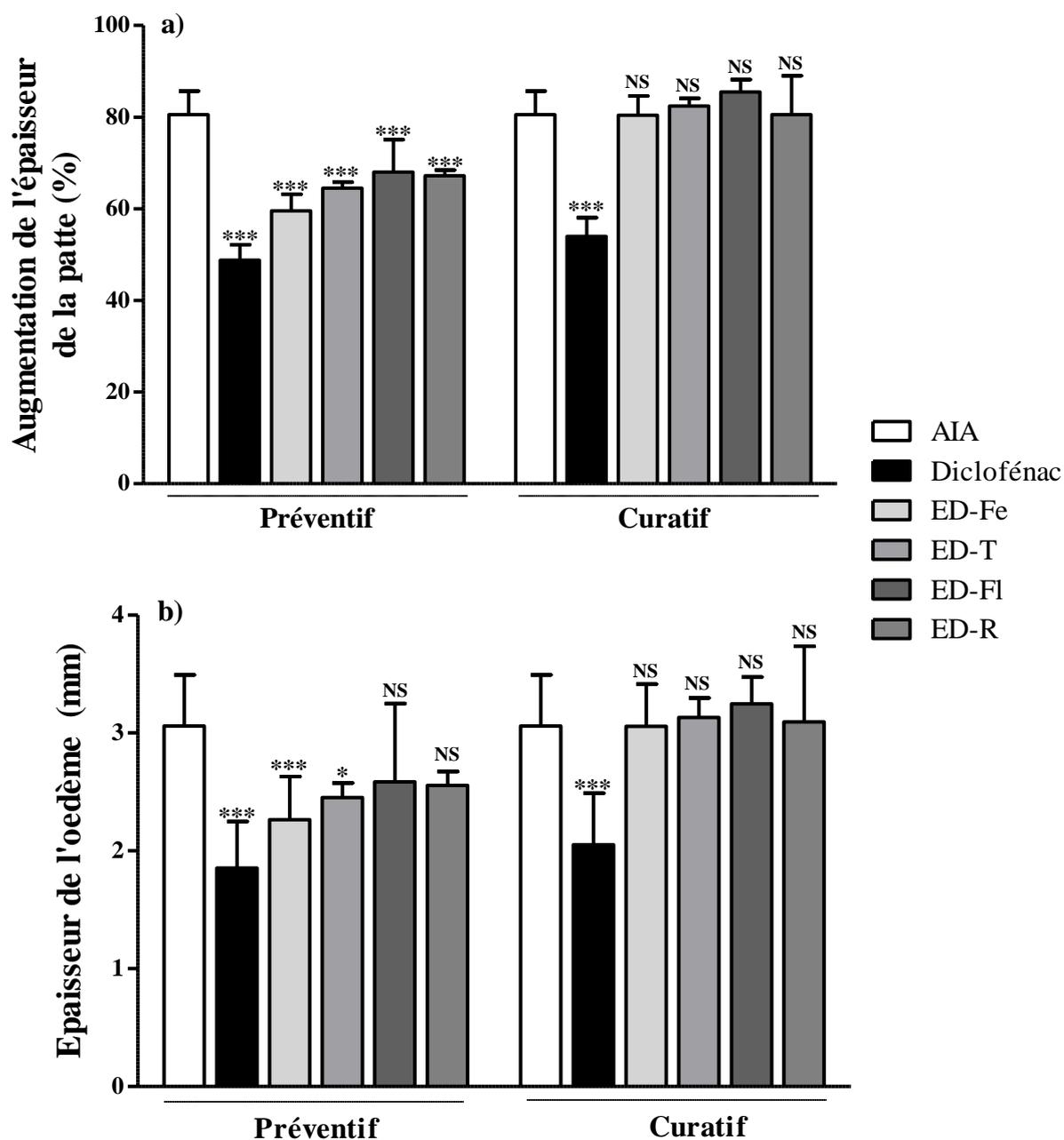


Figure 31. Effets préventif et curatif des extraits méthanoliques délipidés de *Hertia cheirifolia* chez les rats avec AIA. **a)** Taux du gonflement de la patte comparé au groupe AIA. **b)** Epaisseur de la patte comparée au groupe AIA. AIA : groupe arthritique non traité ; Diclofénac : 3 mg/Kg ; ED-Fe : extrait de feuilles ; ED-T : extrait de tiges ; ED-FI : extrait de fleurs ; ED-R : extrait de racines. (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; *** : $p < 0.001$).

Le développement de l'AR chez le rat, suite à l'injection de l'ACF est lié à la réactivité envers les protéines de choc thermique (HSP) faisant partie des protéoglycans du cartilage et à des interactions avec la flore commensale (Prakken *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2016). L'injection de l'ACF en sous-cutané, aboutit au développement d'une réponse inflammatoire chronique qui évolue selon deux phases ; une première phase d'inflammation péri-articulaire aiguë suivie d'une seconde phase d'atteinte osseuse (Pearson, 1956 ; Ferraccioli *et al.*, 2010). Des LT arthritogènes spécifiques des HSP du *mycobacterium* (hsp65) ont été détectés, avec en même temps une réactivité croisée envers les épitopes des HSP de l'hôte. Cette exposition du système immunitaire au *mycobacterium*, stimule une production importante de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6 et TNF α) et diverses chemokines (Billiau et Mathys, 2001 ; Huang *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2016).

Le premier évènement dans la réaction inflammatoire au niveau de la patte correspond à l'infiltration du tissu synovial par les granulocytes et les monocytes, lesquels en absence de contrôle aboutiraient à une amplification de la réaction inflammatoire (Kshirsagar *et al.*, 2014 ; Akramas *et al.*, 2015). La phase chronique de l'AR expérimentale est le résultat d'une production accrue et continue de cytokines pro-inflammatoires par les LT spécifiques (IL-1 β , IL-6, IFN γ et TNF α), de prostaglandines et de radicaux libres. Ces substances inflammatoires, sont responsables de la douleur, de la destruction du cartilage et ultimement de l'érosion osseuse (Jazayeri *et al.*, 2010 ; Noack et Miossec, 2017 ; Ridgley *et al.*, 2018).

Les cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL-6) sont particulièrement impliquées dans la perpétuation de la cascade inflammatoire dans les maladies auto-immunes tandis que l'augmentation des exsudats et la formation de l'œdème sont potentialisés par les prostaglandines *via* la relaxation des vaisseaux sanguins et l'augmentation de l'apport en sang vers le foyer inflammatoire (Noack et Miossec, 2017 ; Alope *et al.*, 2019).

L'évaluation de l'épaisseur de la patte durant toute la période expérimentale a permis un suivi régulier de l'évolution de la formation de l'œdème provoqué par l'injection de l'ACF. Nos résultats montrent que les extraits de HC, administrés en préventif, ont significativement ($p < 0.001$) réduit la formation de l'œdème. Les extraits ED-Fe, ED-T, ED-R et ED-FI ont montré un effet représentant 66.11%, 50.41%, 42.14% et 39.66% respectivement de l'activité inhibitrice de l'œdème exercée par le diclofénac (3 mg/Kg) en préventif. Un effet protecteur exercé par les différents extraits de *H. cheirifolia* est très évident à travers cette atténuation de l'inflammation.

En traitement curatif, les extraits de *H. cheirifolia* auraient un effet protecteur observé notamment durant la période du pic inflammatoire chez le groupe AIA (J14-J21). Cependant, ces extraits n'ont pas montré de réduction significative de l'épaisseur de l'œdème chez les rats à la fin de l'étude. Ainsi, aucun effet inhibiteur de la formation de l'œdème n'a été obtenu en traitement curatif. Ceci pourrait être dû au fait que le traitement curatif soit administré un peu tardivement dans la phase de transition aiguë/chronique (J10 et J14). Un traitement curatif aurait peut-être pu être plus efficace s'il était administré plutôt que J13, avant que la réponse inflammatoire ne devienne plus complexe.

4.1.2. Evolution du poids corporel et poids relatif des organes

Le poids corporel des rats a constitué un autre paramètre clinique de suivi dans notre étude. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 7**. Dans le groupe AIA, le poids corporel a diminué graduellement entre J14 et J28. Une diminution significative ($p < 0.001$) du gain du poids corporel a été enregistrée chez les rats arthritiques par rapport aux rats du groupe normal. Ceci est probablement dû au manque de mobilité des rats à cause de l'inflammation de la patte rendant leur accès à l'aliment limité.

Tableau 07. Gain de poids corporel chez les rats des différents groupes expérimentaux à J7, J14, J21 et J28 après induction de l'AIA.

Groupe	J7	J14	J21	J28
Normal	2.68 ± 0.17	10.3 ± 0.6	13.15 ± 0.78	14.64 ± 0.93
AIA	4.62 ± 0.24 ^{YYY}	8.57 ± 0.55 ^{YYY}	11.85 ± 0.86 ^{YY}	10.11 ± 0.71 ^{YYY}
p-Diclofénac	2.61 ± 0.2 ^{***}	7.53 ± 0.6 ^{NS}	12.06 ± 1.21 ^{NS}	13.51 ± 1.38 ^{***}
pED-Fe	4.29 ± 0.22 ^{NS}	8.88 ± 0.51 ^{NS}	15.09 ± 0.93 ^{***}	12.7 ± 0.74 ^{***}
pED-T	0.93 ± 0.04 ^{***}	6.62 ± 0.38 ^{***}	9.52 ± 0.88 ^{***}	7.18 ± 0.46 ^{***}
pED-Fl	5.73 ± 0.37 [*]	12.03 ± 0.86 ^{***}	17 ± 1.05 ^{***}	15.28 ± 0.95 ^{***}
pED-R	4.04 ± 0.21 ^{NS}	9.12 ± 0.52 ^{NS}	13.54 ± 0.94 ^{***}	11.38 ± 0.71 [*]
cDiclofénac	2.07 ± 0.15 ^{***}	5.95 ± 0.41 ^{***}	11.33 ± 1.01 ^{NS}	13.22 ± 1.03 ^{***}
cED-Fe	3.63 ± 0.26 [*]	9.08 ± 0.58 ^{NS}	13.19 ± 0.93 ^{**}	15.29 ± 1.06 ^{***}
cED-T	1.94 ± 0.14 ^{***}	9.29 ± 0.58 ^{NS}	12.49 ± 0.7 ^{NS}	14.52 ± 0.88 ^{***}
cED-Fl	1.71 ± 0.12 ^{***}	8.67 ± 0.54 ^{NS}	8.82 ± 0.64 ^{***}	14.63 ± 0.98 ^{***}
cED-R	0.48 ± 0.02 ^{***}	6.23 ± 0.3 ^{***}	9.58 ± 0.53 ^{***}	12.65 ± 0.57 ^{***}

¥ : Différence statistique par rapport au groupe normal (¥¥ : $p < 0.01$; ¥¥¥ : $p < 0.001$). * : Différence statistique par rapport au groupe AIA (NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

D'autre part, la réaction inflammatoire provoquée par l'injection de l'ACF stimule la production de la leptine (hormone de la satiété), une hormone cytokine-like, d'où une réduction de la prise d'aliment et par conséquent la perte de poids (Khadem, 2016, La Cava, 2017). Des résultats similaires ont été rapportés au cours de l'AR expérimentale, où la perte de poids est souvent accompagnée d'une prolongation de la durée de l'AR, en raison d'une action locale et/ou systémique des cytokines (TNF α et IL-1 β) stimulant ainsi une dégénérescence musculaire (Kim *et al.*, 2016 ; Dong *et al.*, 2017 ; Mbiancha *et al.*, 2017 ; Alope *et al.*, 2019).

Par ailleurs, une prise de poids significative ($p < 0.01$) a été observée chez les rats traités au diclofénac (3 mg/Kg) ou aux extraits de *H. cheirifolia* (200 mg/Kg), en préventif et en curatif par rapport au groupe AIA (**Tableau 7**). Ceci est probablement lié à leur pouvoir anti-inflammatoire inversant ainsi l'effet de l'arthrite grâce aux molécules bioactives, à savoir les polyphénols. Néanmoins, le groupe pED-T a montré une diminution significative ($p < 0.001$) du poids corporel par rapport au groupe AIA. Une consommation prolongée de cet extrait en serait la cause, par certains polyphénols reconnus également pour leur effet diététique *via* une augmentation de la sensibilité hypothalamique à la leptine réduisant ainsi la prise de poids (Aloke *et al.*, 2019).

Les résultats du poids relatif des différents organes prélevés (foie, rate et thymus) chez les groupes expérimentaux, n'ont révélé aucune différence significative entre les rats arthritiques (AIA) et le groupe normal. Aucune différence n'a été également observée entre les rats traités au diclofénac ou aux extraits de *H. cheirifolia* (préventif et curatif) par rapport au groupe AIA (**Tableau 8**).

Plusieurs travaux ont montré une augmentation du poids des organes viscéraux, notamment du foie, de la rate au cours de l'AIA. Cet effet a été nettement amélioré par l'indométacine ou le diclofénac et grâce à l'administration d'extraits naturels ayant permis une réduction de la sévérité de l'inflammation (Akramas *et al.*, 2015 ; Mbiantcha *et al.*, 2017). Nos résultats seraient expliqués par une inflammation localisée, non disséminée à J28, contrairement aux études précédentes où l'évaluation du poids relatif de ces organes a été réalisée au moment du pic du score inflammatoire (J17 et J19) (Akramas *et al.*, 2015 ; Mbiantcha *et al.*, 2017).

Tableau 8. Index de poids des organes (foie, rate et thymus) par rapport au poids corporel chez les rats des différents groupes à la fin de l'étude (J28).

Groupe	Foie	Rate	Thymus
Normal	3.75 ± 0.51	0.29 ± 0.05	0.19 ± 0.02
AIA	3.61 ± 0.5 ^{NS}	0.37 ± 0.06 ^{NS}	0.2 ± 0.05 ^{NS}
p-Diclofénac	3.92 ± 0.76 ^{NS}	0.36 ± 0.12 ^{NS}	0.19 ± 0.04 ^{NS}
pED-Fe	3.59 ± 0.26 ^{NS}	0.35 ± 0.04 ^{NS}	0.18 ± 0.06 ^{NS}
pED-T	3.33 ± 0.29 ^{NS}	0.3 ± 0.03 ^{NS}	0.18 ± 0.03 ^{NS}
pED-FI	3.45 ± 0.47 ^{NS}	0.3 ± 0.04 ^{NS}	0.2 ± 0.04 ^{NS}
pED-R	3.34 ± 0.37 ^{NS}	0.3 ± 0.02 ^{NS}	0.21 ± 0.04 ^{NS}
cDiclofénac	3.67 ± 0.14 ^{NS}	0.39 ± 0.09 ^{NS}	0.18 ± 0.04 ^{NS}
cED-Fe	3.8 ± 0.25 ^{NS}	0.32 ± 0.03 ^{NS}	0.18 ± 0.03 ^{NS}
cED-T	3.63 ± 0.38 ^{NS}	0.37 ± 0.2 ^{NS}	0.23 ± 0.07 ^{NS}
cED-FI	3.72 ± 0.31 ^{NS}	0.32 ± 0.05 ^{NS}	0.21 ± 0.04 ^{NS}
cED-R	3.46 ± 0.36 ^{NS}	0.32 ± 0.05 ^{NS}	0.18 ± 0.02 ^{NS}

Le groupe AIA est comparé au groupe normal. Les groupes traités en préventif et en curatif sont comparés au groupe contrôle négatif AIA. (NS : non significatif).

4.2. Effet sur les paramètres plasmatiques

Trois paramètres plasmatiques ont été évalués à la fin de l'étude pour chacun des groupes expérimentaux ; le malondialdéhyde (MDA), l'activité de la myéloperoxydase (MPO) et le monoxyde d'azote (NO). Pour chacun de ces paramètres, le groupe contrôle négatif (AIA) est comparé au groupe contrôle normal (sain), tandis que les groupes traités au diclofénac (contrôle positif) ou aux différents extraits de HC, en préventif et en curatif, sont comparés au groupe AIA.

4.2.1. Effet sur le malondialdéhyde plasmatique

L'évaluation du MDA plasmatique, métabolite majeur de la peroxydation lipidique, a servi de marqueur du stress oxydant chez les rats arthritiques ainsi que chez les rats traités au diclofénac ou aux différents extraits de *H. cheirifolia*. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 32**.

Aucune différence significative n'a été observée entre le groupe AIA (0.84 ± 0.13 nmol/mL) et le groupe normal (0.75 ± 0.19 nmol/mL). Le traitement préventif au diclofénac (3 mg/Kg) n'a également montré aucun effet significatif sur la concentration plasmatique du MDA par rapport au groupe AIA (0.85 ± 0.004 vs 0.84 ± 0.13 nmol/mL). Cependant, le traitement préventif aux différents extraits de *H. cheirifolia* a permis une diminution significative ($p < 0.01$) de la concentration du MDA plasmatique chez les rats des groupes ED-Fe, ED-Fl, ED-T et ED-R par rapport au groupe AIA (**Figure 32**).

Dans le cas du traitement curatif, aucune différence du MDA plasmatique n'a été observée entre le groupe traité au diclofénac et le groupe AIA (0.81 ± 0.11 vs 0.84 ± 0.13 nmol/mL), (**Figure 32**). Par ailleurs, les extraits ED-Fe et ED-T ont montré une diminution significative du MDA plasmatique par rapport au groupe AIA (0.58 ± 0.05 vs 0.84 ± 0.13 nmol/mL, $p < 0.01$; 0.65 ± 0.1 vs 0.84 ± 0.13 nmol/mL, $p < 0.05$, respectivement). Tandis que des concentrations équivalentes à celles obtenues chez les rats du groupe AIA ont été retrouvées chez les groupes ED-Fl et ED-R (**Figure 32**).

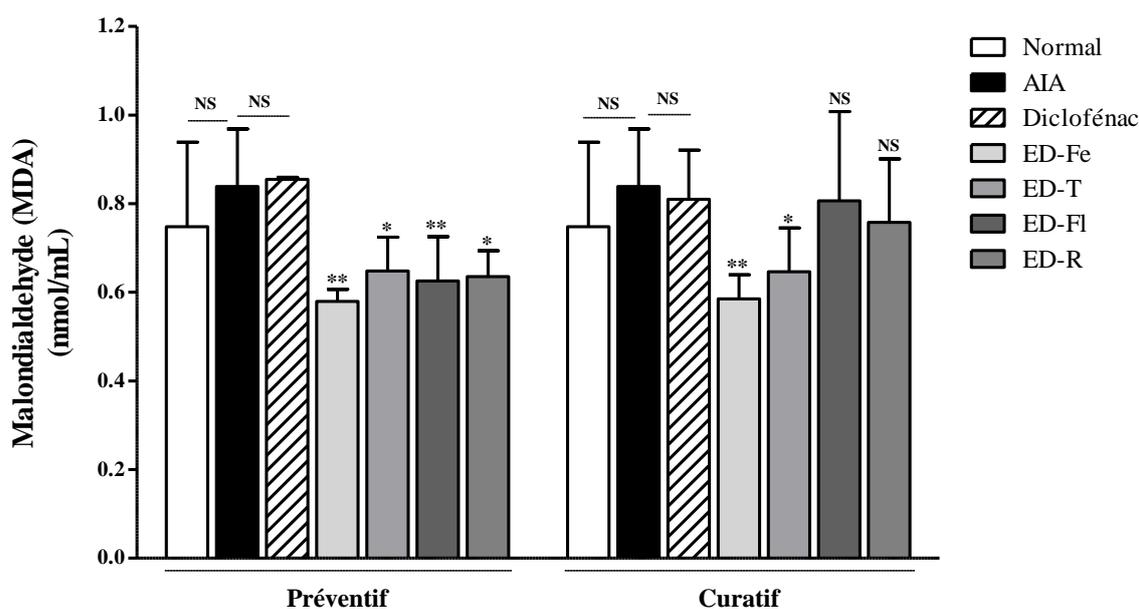


Figure 32. Concentration du MDA plasmatique (nmol/mL) après administration des extraits de *Hertia cheirifolia* en préventif et en curatif dans le modèle de l'AIA chez le rat. ED-Fe : extrait de feuilles ; ED-T : extrait de tiges ; ED-Fl : extrait de fleurs ; ED-R : extrait de racines. (NS : non significatif, $p > 0.05$; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$).

Le MDA est l'un des biomarqueurs du stress oxydant les plus utilisés pour évaluer la peroxydation lipidique. Ce processus cible particulièrement les acides gras polyinsaturés des membranes plasmiques affectant ainsi leur structure et leurs fonctions (Gawel *et al.*, 2004 ; Grotto *et al.*, 2009). Des concentrations élevées en MDA sont le résultat d'une production importante d'ERO et d'un déséquilibre des systèmes antioxydants. Ceci est considéré comme un facteur de risque contribuant à la sévérité des pathologies inflammatoires (Ramana *et al.*, 2013 ; Ito *et al.*, 2019). La production du MDA peut être également formé *via* un processus enzymatique catalysé par les thromboxanes synthétases à partir de précurseurs des prostaglandines (Tsikas *et al.*, 2012 ; Ayala *et al.*, 2014).

Contrairement à nos résultats, plusieurs études ont montré que le MDA plasmatique était très élevé chez les rats arthritiques (Surech *et al.*, 2012 ; Akramas *et al.*, 2015 ; Dong *et al.*, 2017).

Cette différence pourrait être expliquée par le fait que l'évaluation du MDA a été réalisée plutôt dans ces études (J14/J21), au moment où la réaction inflammatoire était à son maximum, pendant la phase active de l'AIA (**Figure 32**). Le MDA serait donc parmi les médiateurs produits à des concentrations élevées pendant cette phase. Il serait également probable, que sa concentration soit plus élevée *in situ*, au niveau du tissu articulaire qu'en systémique (Akramas *et al.*, 2015 ; Alope *et al.*, 2019).

Dans notre travail, l'effet antiarthritique préventif a été plus important entre J17 et J21 par rapport à J28, fin de l'étude. Néanmoins, l'activité antioxydante des extraits de *H. cheirifolia* est très claire par la baisse importante du MDA plasmatique chez les groupes traités par ces extraits (ED-Fe, ED-T, ED-Fl et ED-R) en préventif et en curatif (ED-Fe et ED-T) par rapport au groupe AIA. Il est important de noter qu'aucune différence n'a été retrouvée entre les groupes traités aux extraits de *H. cheirifolia* et le groupe normal.

Plusieurs travaux suggèrent qu'une concentration élevée en ERO aboutit à un environnement pro-oxydant favorable à la production de quantités importantes en MDA au cours de l'AR. Ce produit contribue aux dommages cellulaires et tissulaires *via* les ERO et représente un mécanisme important de l'hyperplasie synoviale et de la dégradation du cartilage (Quiñonez-Flores *et al.*, 2016). En effet, des concentrations élevées en MDA ont été retrouvées dans le liquide synovial et dans le sérum de patients avec AR ainsi que chez les rats avec AIA (El-Barbary *et al.*, 2011 ; Hemshekhar *et al.*, 2012 ; Al-Muhtaseb *et al.*, 2019).

4.2.2. Effet sur la myéloperoxydase plasmatique

L'activité de la MPO, considérée à la fois comme indicateur du stress oxydant et de l'inflammation, est aussi un marqueur d'une infiltration du site enflammé par les neutrophiles

(Mudgal *et al.*, 2014 ; Gonçalves *et al.*, 2017). L'évaluation de l'activité de la MPO plasmatique dans notre étude, a révélé les résultats présentés dans la **figure 33**.

Les valeurs obtenues chez les rats arthritiques (AIA) (199.86 ± 37.62 U/L) ont été significativement ($p < 0.01$) supérieures aux valeurs obtenues chez le groupe normal (145.08 ± 25.65 U/L). Le traitement préventif au diclofénac a permis une diminution significative ($p < 0.001$) de l'activité de la MPO par rapport au groupe AIA (130.8 ± 24.78 U/L *vs* 199.86 ± 37.62 U/L, respectivement).

De même, une diminution significative ($p < 0.05$) de l'activité de la MPO plasmatique a été observée dans les quatre groupes traités aux différents extraits, ED-Fe (152.58 ± 30.82 U/L), ED-T (156.37 ± 25.5 U/L), ED-FI (153.38 ± 17.13 U/L) et ED-R (154.04 ± 20.4 U/L), par rapport au groupe arthritique (AIA) (199.86 ± 37.62 U/L), (**Figure 33**).

Le diclofénac est un membre des AINS utilisé dans le traitement de l'AR à court terme. Son potentiel anti-inflammatoire est attribué à son mécanisme d'action inhibiteur des COX (1 et 2), interrompant ainsi la synthèse des PGE fortement impliquées dans l'inflammation. Un effet important du diclofénac est observé sur l'activité de la MPO. Il est probablement lié à l'inhibition de la synthèse des PGE₂, d'où une diminution de l'infiltration de l'articulation par les neutrophiles et donc une réduction de leur action inflammatoire (Gan, 2010 ; Alope *et al.*, 2019).

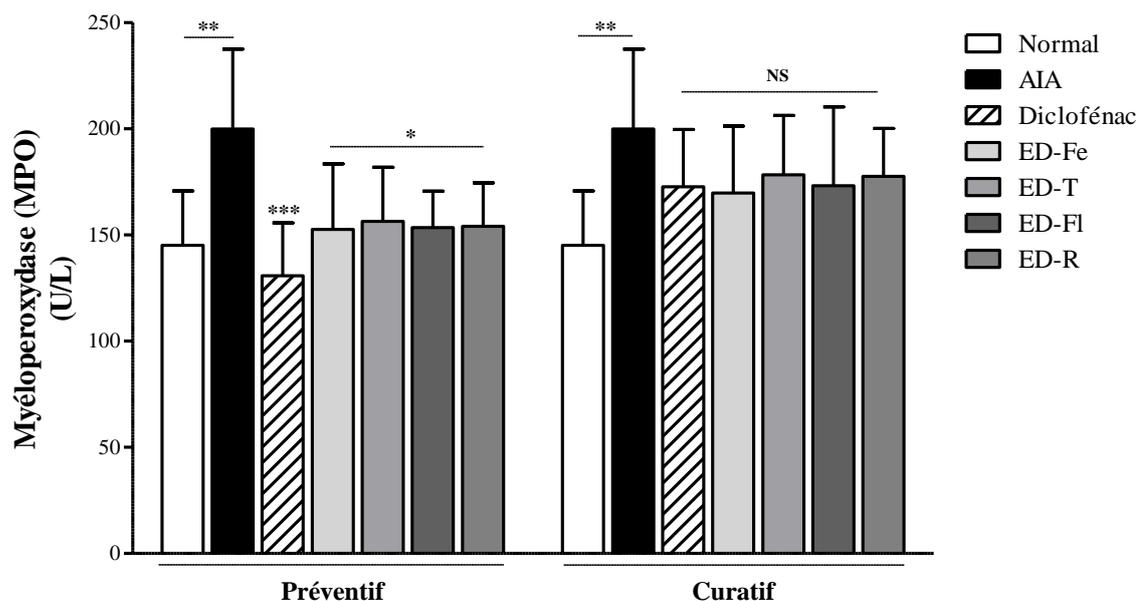


Figure 33. Activité de la MPO plasmatique (U/L) après administration des extraits de *Hertia cheirifolia* en préventif et en curatif dans le modèle de l'AIA chez le rat. ED-Fe : extrait de feuilles, ED-T : extrait de tiges, ED-Fl : extrait de fleurs, ED-R : extrait de racines. (NS : non significatif, $p > 0.05$; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$).

Dans le cas du traitement curatif administré à J13 après induction de l'AR, aucune différence significative de l'activité de la MPO plasmatique n'a été retrouvée dans le groupe traité au diclofénac (172.64 ± 26.96 U/L) ainsi que dans les groupes traités aux différents extraits de HC ; ED-Fe (169.65 ± 31.58 U/L), ED-T (178.28 ± 27.97 U/L), ED-Fl (173.08 ± 37.21 U/L), ED-R (177.55 ± 22.49 U/L), par rapport au groupe AIA (199.86 ± 37.62 U/L). Par ailleurs, ces valeurs sont équivalentes ($p > 0.05$) à celles obtenues dans le groupe normal (145.08 ± 25.65 U/L), (**Figure 33**).

La MPO, protéine majeure des neutrophiles, est une enzyme à hème stockée dans les granules primaires des neutrophiles. Elle est également retrouvée à faibles concentrations dans les monocytes et les macrophages (Kato, 2016 ; Aratani, 2018). En plus de son rôle bactéricide intracellulaire *via* le système MPO/HOCl, la MPO est sécrétée dans le milieu extracellulaire

et peut causer des dommages tissulaires importants au niveau du foyer inflammatoire. En présence du H₂O₂ et d'un halogène (Cl⁻, Br⁻ ou SCN⁻), la MPO catalyse la formation de médiateurs réactifs puissants (HOCl, HOBr et HOSCN, respectivement), lesquels possèdent des capacités délétères potentielles altérant les protéines, les lipides et/ou l'ADN (Klebanoff, 2005 ; Mittal *et al.*, 2014 ; Khan *et al.*, 2018).

Les résultats sont en faveur d'un effet préventif exercé par les différents extraits de *H. cheirifolia* envers le développement de l'AR chez le rat. Cet effet préventif passe probablement *via* l'inhibition de la synthèse ou de l'activité des médiateurs pro-inflammatoires, dont la MPO. Les valeurs de l'activité de la MPO plasmatique sont en concordance avec l'évolution de la formation de l'œdème dans l'étude préventive. Par ailleurs, les résultats obtenus dans l'étude curative sont en faveur d'un effet bénéfique du diclofénac et des extraits de *H. cheirifolia* administrés en curatif et coïncident avec cette amélioration de l'évolution de la formation de l'œdème observée notamment entre J14 et J21.

Plusieurs études ont souligné le rôle de la MPO dans la pathogenèse de diverses pathologies chroniques telles que l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires, la sclérose en plaques, les maladies neurodégénératives et l'arthrite rhumatoïde (Khan *et al.*, 2018 ; Arnhol, 2020). De plus, il a été démontré que les neutrophiles, source principale de la MPO, sont des effecteurs majeurs de l'inflammation responsables des lésions articulaires chez les patients arthritiques ainsi que chez les rats avec AR expérimentale (Wang *et al.*, 2014 ; Odobasic *et al.*, 2014).

La MPO est ainsi considérée comme biomarqueur d'une infiltration des tissus enflammés par les neutrophiles, et constitue une cible thérapeutique importante dans le traitement de l'inflammation chronique (Odobasic *et al.*, 2014 ; Wang *et al.*, 2014 ; Khan *et al.*, 2018). En effet, l'efficacité des thérapies antiarthritiques telles que le méthotrexate et les inhibiteurs du

TNF α , a été associée à une diminution de l'activité de ces cellules. Nos résultats corroborent plusieurs études ayant démontré que la MPO est fortement impliquée dans la pathogenèse de l'AR et joue le rôle d'un effecteur pro-inflammatoire important (Stamp *et al.*, 2012 ; Odobasic *et al.*, 2014 ; Dong *et al.*, 2017 ; Gonçalves *et al.*, 2017).

4.2.3. Effet sur la production du monoxyde d'azote

Le NO est un autre médiateur de l'inflammation et du stress oxydant connu pour son rôle dans la pathogenèse de l'AR. Avec les autres substances réactives (H₂O₂, OH⁻ et O₂⁻), le NO joue un rôle primordial dans les lésions articulaires survenant lors de l'AR. Le système antioxydant endogène (SOD, GSH, CAT) est alors activé afin de restaurer une homéostasie dans le microenvironnement articulaire. Cependant, lors d'une réponse inflammatoire intense, ce mécanisme de défense est réprimé en faveur d'un excès de production d'ERO conduisant à des dommages tissulaires importants (Kunsch *et al.*, 2005 ; Shah *et al.*, 2013 ; Quiñonez-Flores *et al.*, 2016).

Dans ce travail, l'évaluation du NO plasmatique, utilisant la droite standard (**Annexe 7**), n'a montré aucune différence significative entre les rats arthritiques (AIA) et les rats sains du groupe normal (19.91 ± 1.07 vs 22.7 ± 2.82 μ M), (**Figure 34**). Aucun effet n'a été observé également dans les groupes des rats traités au diclofénac en préventif ou en curatif (20.34 ± 2.77 et 19.76 ± 2.67 μ M, respectivement) par rapport au groupe AIA (19.91 ± 1.07 μ M) (**Figure 34**).

Le même résultat a été obtenu dans les groupes expérimentaux traités aux différents extraits de *H. cheirifolia* en préventif et en curatif respectivement ; ED-Fe (17.14 ± 1.07 μ M ; 18.72 ± 2.4 μ M), ED-T (19.59 ± 4.17 μ M ; 18.91 ± 3.36 μ M), ED-Fl (17.21 ± 1.31 μ M ; 20.47 ± 2.16 μ M), ED-R (21.46 ± 3.41 μ M ; 22.89 ± 2.45 μ M) (**Figure 34**).

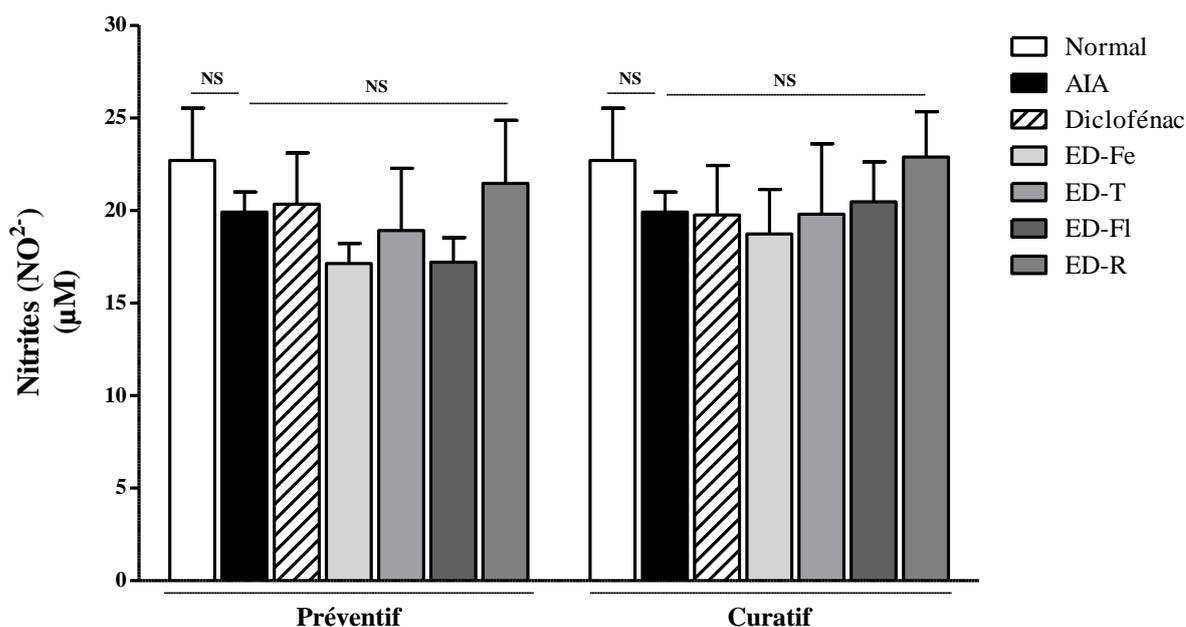


Figure 34. Concentration du NO plasmatique après administration des extraits de *Hertia cheirifolia* en préventif et en curatif dans le modèle de l'AIA chez le rat. ED-Fe : extrait de feuilles, ED-T : extrait de tiges, ED-Fl : extrait de fleurs, ED-R : extrait de racines. (NS : non significatif, $p > 0.05$).

Le NO est un médiateur physiologique produit à partir de la L-arginine par les différentes isoformes de la NO-Synthase (NOS). Trois isoformes de la NOS ont été décrites, la forme constitutive (cNOS) dont l'isoforme endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS) produisant le NO de façon transitoire et à faibles quantités. Elle est particulièrement impliquée dans la signalisation intra- et intercellulaire par la modulation du tonus musculaire et du flux sanguin (eNOS) et par modulation de la plasticité synaptique (nNOS). Et l'isoforme inducible (iNOS), capable de générer des quantités importantes de NO et reconnue comme composante effectrice de la réponse immune notamment dans la réponse inflammatoire (Jang et Murell, 1998 ; Nagy *et al.*, 2010). L'iNOS est induite par les cytokines (IL-1 β , TNF α et IFN γ) et endotoxines dans divers types cellulaires (endothéliales, macrophages, neutrophiles, chondrocytes et synoviocytes). Elle a été particulièrement incriminée dans diverses

pathologies inflammatoires dont l'AR (Nagy *et al.*, 2010 ; Pal *et al.*, 2015 ; Quiñonez-Flores *et al.*, 2016).

Plusieurs travaux ont montré que le NO est fortement impliqué dans la pathogenèse de l'AR, aussi bien chez l'Homme que dans le modèle expérimental (Jang et Murell, 1998 ; Vasanthi *et al.*, 2009 ; Pal *et al.*, 2015). Des concentrations élevées en NO ont été retrouvées dans le liquide synovial et dans le sérum ainsi que dans les cultures de synoviocytes de type fibroblastes (Farell *et al.*, 1992 ; Shah *et al.*, 2013 ; Pal *et al.*, 2015 ; Al-Muhateb *et al.*, 2019).

Cannon *et al.* (1996) ont montré une élévation significative des nitrates urinaires et/ou de l'expression de l'iNOS dans les tissus articulaires chez les rats avec arthrite expérimentale (AIA et AIC). De plus, une immunisation avec une protéine de choc thermique du *Mycobacterium bovis* (mbHSP) a permis une atténuation de l'AR accompagnée d'une diminution du NO par rapport au contrôle arthritique. Il est à noter que ces résultats ont été obtenus aux J19 et J23 après induction de l'AR expérimentale, correspondant au pic du score arthritique dans chacun des deux modèles (Cannon *et al.*, 1996). D'autres investigateurs ont montré une réduction de la sévérité de l'AR expérimentale suite à une injection du N-méthyl-L-arginine, inhibiteur de la iNOS, d'où un rôle fondamental du NO dans la pathogenèse de l'AR. Cependant, une autre évaluation de différents inhibiteurs de l'iNOS dans l'AIA ont montré que l'aminoguanidine a permis une bonne réduction de la sécrétion urinaire des nitrates sans réduction de la sévérité de l'AR (Fletcher *et al.*, 1998 ; Mnaimneh *et al.*, 2004).

Par ailleurs, Connor *et al.* (1995) et Veihelmann *et al.* (2002) ont montré que le rôle du NO serait précoce dans le processus pathogénique de l'AIA bien avant la survenue des dommages articulaires. En effet, des concentrations maximales du NO plasmatique ont été détectées une

semaine (J14) avant l'atteinte du score maximal de l'inflammation de la patte (J21). Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés par Cannon *et al.* (1996).

Ceci expliquerait bien le résultat obtenu dans notre étude puisque le dosage du NO plasmatique a été réalisé à la fin de l'étude (J28), au moins une semaine après le pic de l'inflammation articulaire. Le NO serait donc plus impliqué dans la phase aiguë de l'AIA précédant l'atteinte articulaire mais contribuerait fortement aux lésions du tissu articulaire survenant lors de l'AR. Ces résultats sont en ligne avec ceux obtenus pour le MDA plasmatique.

Ces données suggèrent que les dommages tissulaires au niveau de l'articulation sont précédés par une production importante du NO et un effet cumulatif du NO serait à l'origine des dommages articulaires. Le NO se combine aux radicaux OH et forme une molécule azotée hautement réactive, le peroxy-nitrite (OONO^-) responsable des lésions articulaires durant l'AR (Connor *et al.*, 1995). Le NO joue également un rôle activateur de la COX, générant ainsi les prostaglandines largement impliquées dans la pathogenèse de l'AR humaine et l'AIA chez le rat (Connor *et al.*, 1995 ; Jang et Murell, 1998).

4.3. Effet sur la structure histologique

L'analyse des coupes histologiques réalisées sur l'articulation tibio-tarsienne de la cheville et interphalangienne de la patte droite de chaque rat des différents groupes, a révélé les résultats présentés dans les **figures 35, 36 et 37**. Le groupe normal a montré une histologie synoviale saine et préservée sans aucun signe d'inflammation (hyperplasie synoviale, dégradation du cartilage, infiltrat leucocytaire et formation du pannus), (**Figure 35.a**). Dans le groupe AIA, des lésions histologiques importantes ont été observées caractérisées par une hyperplasie synoviale sévère, une infiltration massive de leucocytes, une dégénérescence du cartilage et une prolifération des tissus synoviaux (**Figure 35.b**).

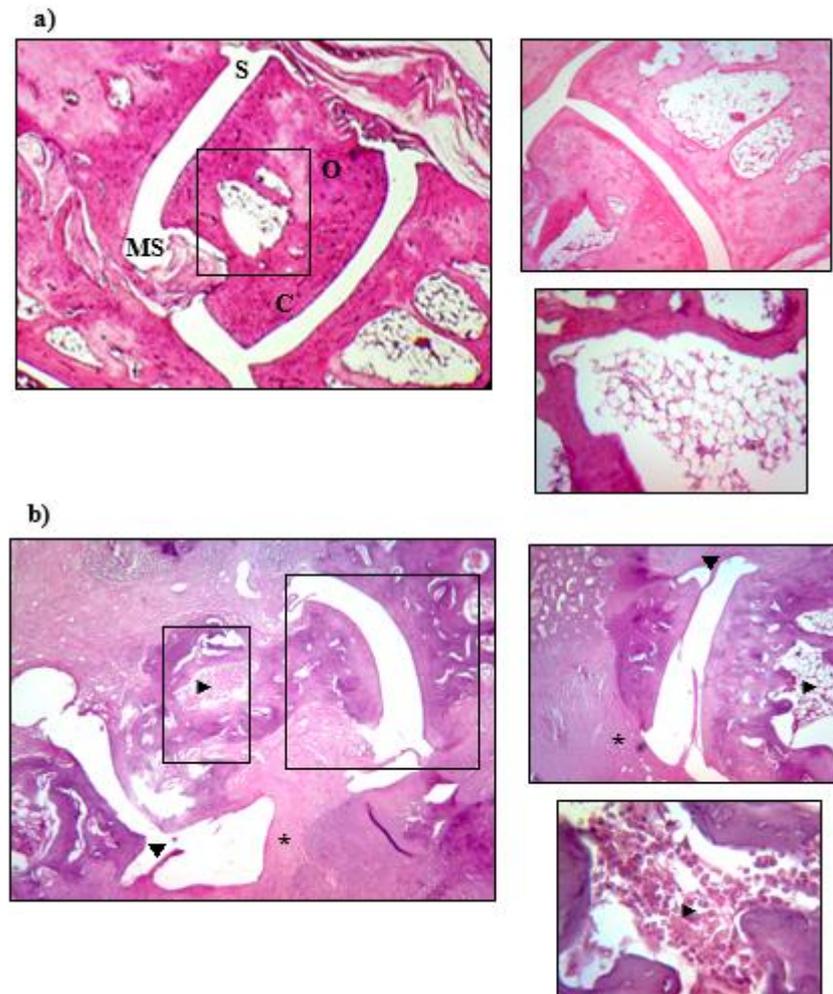


Figure 35. Observation microscopique de la structure histologique de l'articulation de la patte chez le rat (G : 10x10 ; 10x20 et 10x40). **a)** Groupe contrôle normal. **b)** Groupe AIA. O : os ; C : cartilage ; S : synoviale ; MS : membrane synoviale ; ▶ : infiltrat inflammatoire ; ▼ : hyperplasie synoviale ; * : formation du pannus.

Par ailleurs, les groupes traités au diclofénac (3 mg/Kg), en préventif et en thérapeutique, ont montré une nette amélioration des symptômes histopathologiques associés à l'AR. Un profil histologique très proche du groupe normal a été observé montrant une absence de la formation du pannus, aucune destruction du cartilage et un infiltrat cellulaire minime (**Figures 36.b et 37.b**).

Dans les groupes des rats arthritiques traités aux différents extraits de *H. cheirifolia* en préventif (pED-Fe, pED-T, pED-Fl et pED-R), une diminution significative des manifestations histopathologiques a été retrouvée par rapport au groupe AIA. Une bordure du cartilage régulière et intacte, une faible hyperplasie synoviale, et un léger infiltrat cellulaire ont été observés (**Figure 36**). Cependant, une histologie évocatrice d'une atteinte inflammatoire de l'articulation a été observée chez les rats arthritiques traités aux différents extraits de *H. cheirifolia* en curatif (cED-Fe, cED-T, cED-Fl et cED-R) (**Figure 37**). Néanmoins, une légère amélioration a été remarquée par rapport au groupe AIA. Cette amélioration est moins importante que celle obtenue dans le cas du traitement préventif.

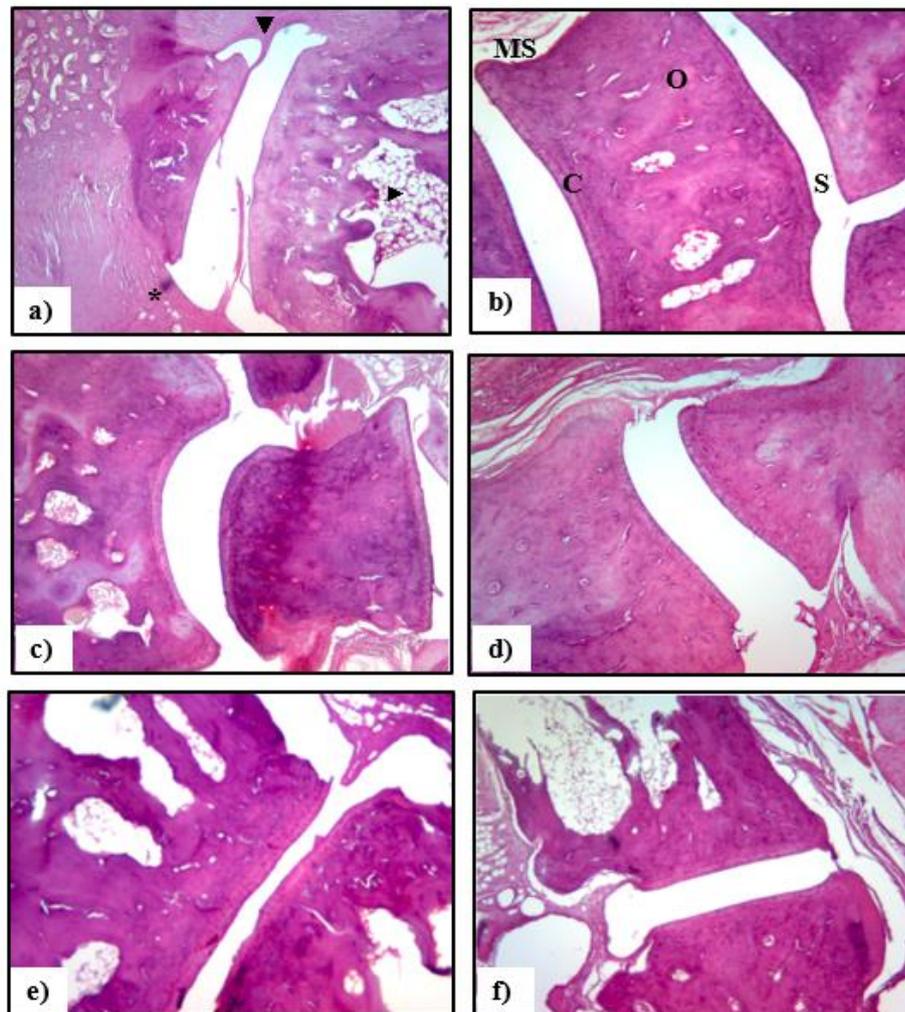


Figure 36. Observation microscopique de la structure histologique de l'articulation de la patte chez les rats traités en préventif au diclofénac (3 mg/Kg) et aux extraits de *Hertia cheirifolia* (200 mg/Kg) (G : 10x20). **a)** Groupe AIA. **b)** Groupe contrôle positif. **c)** Groupe pED-Fe. **d)** Groupe pED-T. **e)** Groupe pED-Fl. **f)** Groupe pED-R. O : os ; C : cartilage ; S : synoviale ; MS : membrane synoviale ; ► : infiltrat inflammatoire ; ▼ : hyperplasie synoviale ; * : formation du pannus.

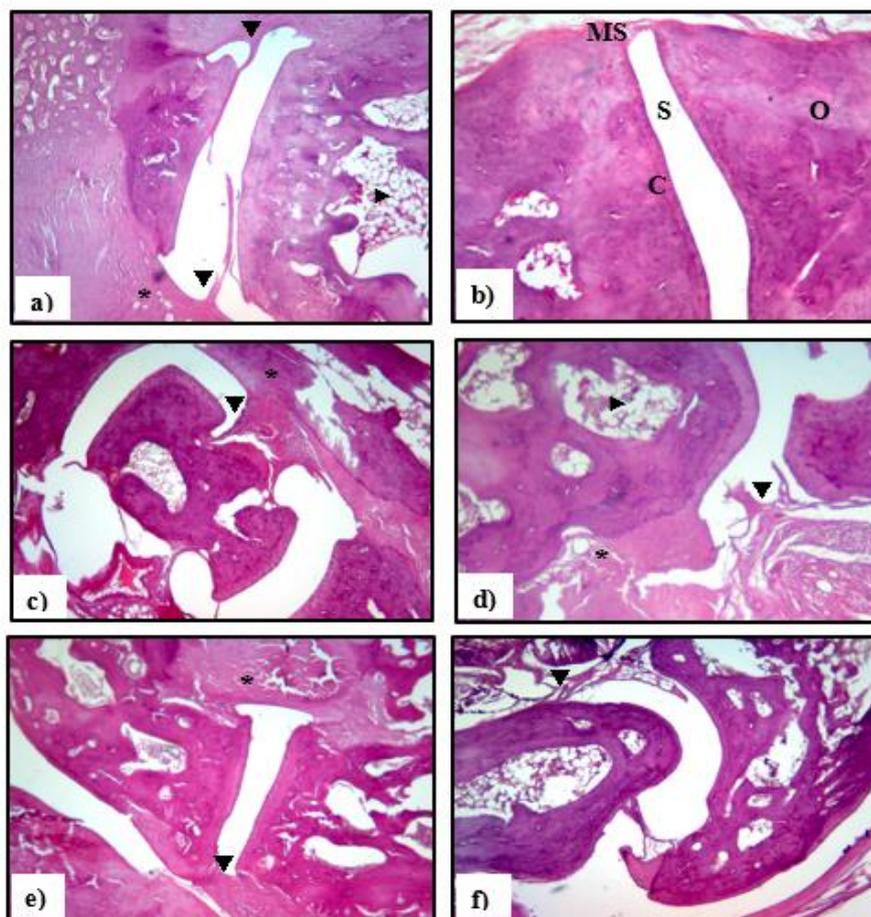


Figure 37. Observation microscopique de la structure histologique de l'articulation de la patte chez les rats traités en curatif au diclofénac (3 mg/Kg) et aux extraits de *Hertia cheirifolia* (200 mg/Kg) (G : 10x20). **a)** Groupe AIA. **b)** Groupe contrôle positif. **c)** Groupe cED-Fe. **d)** Groupe cED-T. **e)** Groupe cED-Fl. **f)** Groupe cED-R. O : os ; C : cartilage ; S : synoviale ; MS : membrane synoviale ; ► : infiltrat inflammatoire ; ▼ : hyperplasie synoviale ; * : formation du pannus.

A la lumière de ces observations, il apparaît que le traitement préventif des rats arthritiques par les différents extraits de *H. cheirifolia* a permis une nette amélioration de l'atteinte articulaire par rapport au groupe AIA. Une suppression quasi-totale de l'inflammation a été obtenue chez les rats traités au diclofénac, tandis qu'une inflammation modérée a été observée chez les groupes traités en curatif. Ces résultats révèlent un effet anti-inflammatoire protecteur exercé par les différents extraits de *H. cheirifolia* contre les dommages articulaires induits par l'injection de l'ACF.

Ceci est en accord avec les résultats des paramètres sériques, notamment la MPO supportant un effet préventif anti-inflammatoire et antiarthritique exercé par les différents extraits de HC. Des études récentes ont montré des résultats similaires dans le modèle de l'AIA (Aloke *et al.*, 2018 ; Hasan *et al.*, 2018 ; Cui *et al.*, 2019).

Le développement de l'AIA se fait en trois phases, débutant par la phase d'induction sans aucune évidence de synovite, suivie de la phase de synovite précoce puis la phase de synovite retardée avec destruction progressive du cartilage. Un agent anti-inflammatoire a la propriété de bloquer une ou l'ensemble de ces étapes (Jitta *et al.*, 2019). Ceci est particulièrement démontré par l'action du diclofénac administré en préventif au moment de l'induction de l'AIA et en curatif au moment de la phase de transition aiguë/chronique.

La formation du pannus, l'infiltration leucocytaire, la dégradation du cartilage et l'érosion osseuse sont les principales caractéristiques de l'AIA. La synoviale étant la cible principale de l'inflammation dans l'AR et les synoviocytes de type fibroblastes (FLS), les acteurs primordiaux dans la pathogenèse de l'AR (Dong *et al.*, 2017).

La dégradation du cartilage est le résultat d'une action combinée entre le stress mécanique et biochimique causé principalement par les ERO. L'action des extraits de *H. cheirifolia* serait donc responsable de l'induction d'un rééquilibrage du stress oxydant grâce aux substances antioxydantes contenues dans ces extraits. Ces substances bioactives agiraient principalement par neutralisation des radicaux libres, inhibition des réactions de leurs formation ou par chélation des ions métalliques, cofacteurs majeurs des réactions oxydatives (Honrentin et Kurz, 2007 ; Akramas *et al.*, 2015).

L'activité anti-arthrite rhumatoïde des extraits de *H. cheirifolia* observée dans notre étude serait donc fortement associée aux composés phénoliques contenus dans chacun des extraits étudiés. Les polyphénols sont depuis longtemps reconnus pour leurs différents bienfaits pour

la santé, grâce à leurs activités antioxydante, anti-inflammatoire et immunomodulatrice (Chiva-Blanch et Visioli, 2012 ; Hussain *et al.*, 2016 ; Cory *et al.*, 2018). Plusieurs études ont démontré leur potentiel anti-inflammatoire au cours de l'AR grâce à leur activité neutralisant les radicaux libres et leur capacité à interférer dans les différentes voies pro-inflammatoires, impliquées notamment dans l'hyperplasie synoviale, la dégradation du cartilage et la destruction osseuse (Oliviero *et al.*, 2015 ; Rosillo *et al.*, 2016 ; Oliviero *et al.*, 2017).

L'effet des polyphénols a été particulièrement exploré sur les cytokines, les métalloprotéases, et les médiateurs du stress oxydant responsables de la rupture de l'homéostasie synoviale et par conséquent de l'érosion osseuse (McInnes et Schett, 2017 ; Orr *et al.*, 2017 ; Al-Muhtaseb *et al.*, 2019). Le modèle de l'AIA est l'un des principaux modèles de l'AR utilisé pour étudier l'effet d'extraits de différentes plantes médicinales sur la production de médiateurs pro- et anti-inflammatoires et l'activation des défenses antioxydantes au cours de l'AR expérimentale (Gonçalves *et al.*, 2017 ; Mbiancha *et al.*, 2017 ; Jitta *et al.*, 2019).

Des études récentes ont montré que les polyphénols sont capables d'atténuer la sévérité de l'AIA chez le rat par la diminution de différents médiateurs inflammatoires (MMP-3, TNF α , MPO, CRP et MDA). En parallèle, une élévation de l'IL-10 et du GSH, connus pour leur rôle anti-inflammatoire a été observée (Wahba *et al.*, 2016 ; Neog *et al.*, 2017).

De plus, des études *in vitro* sur des synoviocytes de type fibroblastes activés, supportent également l'effet bénéfique des polyphénols *via* la suppression des différents médiateurs inflammatoires (IL-6, COX2, VEGF et NF κ B) et l'induction de l'apoptose (Kloesch *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2013 ; McInnes et Schett ; 2017).

Dans notre travail, l'analyse par HPLC-DAD des quatre extraits de *H. cheirifolia* (ED-Fe, ED-T, ED-Fl et ED-R) a révélé la présence de sept molécules bioactives dont, quatre dérivées de l'acide caféique, la rutine et deux molécules dérivées de la rutine.

Les acides phénoliques représentent environ le tiers des composés phénoliques de notre alimentation et sont retrouvés dans pratiquement toutes les plantes. Les acides caféique, gallique et férulique sont les plus communs des acides phénoliques (Sung *et al.*, 2019). Des études *in vitro* sur des synoviocytes de type fibroblaste, et *in vivo* dans le modèle de l'AIA chez le rat, ont montré le rôle de l'acide caféique dans l'inhibition de la production des médiateurs pro-inflammatoires (IL-1 β , NF κ B et MMP-9) et dans l'atténuation de la sévérité de l'AIA (Armutcu *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2017). Un effet inhibiteur des médiateurs du stress oxydant a été également retrouvé (MDA et NO), en plus d'une augmentation du glutathion réduit (GSH) chez les animaux arthritiques (Fikry *et al.*, 2019).

Les flavonoïdes sont également dotés d'importantes activités antioxydantes et anti-inflammatoires. Ces activités sont étroitement liées au nombre et à la position des groupes hydroxyle libres portés par les anneaux aromatiques de ces composés (Islam *et al.*, 2016). L'efficacité de la rutine dans l'atténuation de l'AIA chez le rat a été clairement démontrée. Elle agit particulièrement par la neutralisation des radicaux libres fortement impliqués dans les dommages cellulaires du cartilage, et par l'inhibition de la peroxydation lipidique. Ce qui permet une activation du système antioxydant endogène et une inhibition de l'activation et de l'accumulation des neutrophiles (Rao, 2015 ; Sun *et al.*, 2017 ; Sung *et al.*, 2019).

Enfin, l'amélioration des paramètres arthritiques observée suite à l'administration des différents extraits de *H. cheirifolia* en préventif, a été accompagnée d'une baisse significative des marqueurs de l'inflammation et du stress oxydant (MPO et MDA). Ceci montre que le rôle protecteur des extraits de *H. cheirifolia* serait en partie attribué à leur activité anti-inflammatoire et antioxydante grâce aux différents composés phénoliques contenus dans chacun de ces extraits.

III. Conclusion et Perspectives

Conclusion

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie auto-immune chronique des articulations caractérisée par la douleur, une raideur musculaire, et à terme une déformation et une perte de la fonction articulaire. Le développement de cette pathologie est lié un ensemble d'interactions complexes entre des facteurs génétiques et environnementaux *via* une réponse auto-immune chronique contribuant à l'exacerbation de l'inflammation. L'AR nécessite un traitement à long terme conduisant à un nombre important d'effets secondaires.

Dans ce travail, tout l'intérêt a été axé sur les extraits méthanoliques riches en composés phénoliques et sur leurs activités antioxydantes (*in vitro*) et anti-inflammatoires (*in vivo*), particulièrement dans le modèle de l'AR induite à l'adjuvant de Freund chez le rat.

L'évaluation du CTP et CTF et l'analyse par HPLC-DAD ont permis de démontrer que la plante *Hertia cheirifolia* est une source non négligeable de composés phénoliques, notamment de flavonoïdes (rutine et dérivés). Ces composés contenus à des concentrations très variables dans les différents extraits de cette plante sont à l'origine de l'activité antioxydante révélée par les tests *in vitro*. L'activité anti-inflammatoire a été également clairement démontrée *in vivo*, dans les modèles de l'inflammation aiguë ainsi que dans l'inflammation chronique.

Les résultats obtenus montrent que parmi les quatre extraits de *H. cheirifolia* étudiés, l'extrait de feuille (ED-Fe) a été le plus efficace dans les essais antioxydants ainsi que dans les modèles animaux de l'inflammation aiguë et chronique. Les autres extraits ne sont pas moins efficaces et constituent en plus des feuilles, une source supplémentaire de molécules bioactives de la plante *Hertia cheirifolia* à potentiel thérapeutique et préventif.

La présente étude constitue ainsi un apport scientifique important supportant l'usage de cette plante en thérapie traditionnelle.

Perspectives

Par ailleurs, d'autres voies non explorées dans cette étude feraient l'objet d'autres travaux à l'avenir. Il s'agit particulièrement de l'utilisation de la graine de *H. cheirifolia* et la préparation d'extraits aqueux des différentes parties de la plante. Il serait également intéressant de travailler sur les huiles essentielles de *Hertia cheirifolia*, qui est une plante aromatique. De plus, il serait recommandé de réaliser d'autres études plus approfondies tant sur la composition chimique de ces extraits afin d'identifier les molécules bioactives et de les purifier, que sur leur mécanismes d'action (voies de signalisation). Ceci aurait une contribution considérable quant au développement de nouvelles molécules à visée pharmacologique.

Enfin, d'autres molécules non phénoliques pourraient être également impliquées dans les différentes vertus que possède *H. cheirifolia*. Ceci constituerait un autre aspect à explorer avec beaucoup d'intérêt dans des travaux futurs.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abbas M, Saeed F, Anjum FM, Afzaal M, Tufail T, Bashir MS, Ishtiaq A, Hussain S, Suleria HAR. (2017). Natural polyphenols : An overview. *International Journal of Food Properties*, 20(8) :1689-1699.
- Abdelghaphar OAM, Abo-Youssef AM, Abo-Saif AA. (2018). Effect of Losartan in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17 (4), 1420-1430.
- Abdelouhab K, Rafa H, Toumi R, Bouaziz S, Medjeber O, Touil-Boukoffa C. (2012). Mucosal intestinal alteration in experimental colitis correlates with nitric oxide production by peritoneal macrophages : Effect of probiotics and prebiotics. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 34(4), 590-597.
- Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. (2018). The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation : A review. *Veterinary World*, 11(5), 627-635.
- Aggrey AA, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. (2013). Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. *Journal of Immunology*. 190, 4685-4691.
- Ahmed M, Aissat S, Djebli N. (2012). Is the prooxidant effect of polyphenols harmful ? *Medicinal and Aromatic Plants*, 1(8), e132.
- Akramas L, Leonavičienė L, Vasiliauskas A, Bradūnaitė R, Vaitkienė D, Zabulytė D, Normantienė T, Lukošius A, Jonauskienė I. (2015). Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of herbal preparation EM 1201 in adjuvant arthritic rats. *Medicina*, 51, 368-377.
- Al-Nahain A, Jahan R, Rahmatullah M. (2014a). *Zingiber officinale* : A potential plant against rheumatoid arthritis. *Arthritis*, 2014, 159089.
- Al-Nahain R, Rahman T, Jahan R, Chowdhury AR, Rahmatullah M. (2014b). Potential therapeutic benefits of *Aloe barbadensis* in treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmune Diseases and Rheumatology*, 2, 35-44.
- Aletaha D, Smolen JS. (2018). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. A Review. *Journal of the American Medical Association*, 320(13), 1360-1372.
- Alipour B, Homayouni-Rad A, Vaghef-Mehrabany E, Sharif SK, Vaghef-Mehrabany L, et al. (2014). Effects of *Lactobacillus casei* supplementation on disease activity and inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients : a randomized double-blind clinical trial. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 17, 519-27.
- Al-Muhtaseb N, Al-Kaissi E, Muhi-Eldeen Z, Almohtadi A, Al-Muhtaseb S. (2019). Serum and synovial fluid oxidants and antioxidants as risk factors in rheumatoid arthritis patients. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*, 8(8), 1487-1506.
- Aloke C, Ibiem CU, Orji OU, Ugwuja EI, Ezeani NN, Aja PM, Obasi NA. (2019). Anti-arthritis potentials of ethanol and aqueous extracts of stem bark of *Cleistopholis patens* on complete Freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 12(1), 28-34.

- Alpizar-Rodriguez D, Pluchino N, Canny G, Gabay C, Finckh A. (2017). The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 56(8), 1254-1263.
- Amarowicz R, Narolewska O, Karamać M, Kosińska A, Weidner S. (2008). Grapevine leaves as a source of natural antioxidants. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 58 (1), 73-78.
- Amdekar S, Singh V, Singh R, Sharma P, Keshav P, Kumar A. Lactobacillus casei reduces the inflammatory joint damage associated with collagen-induced arthritis (CIA) by reducing the pro-inflammatory cytokines : Lactobacillus casei : COX-2 inhibitor. *Journal of Clinical Immunology*, 31, 147-54.
- Amira K, Touahria C, Djeghader NEH, Boudjelida H. (2018). Laboratory study of the larvicidal efficacy of a local plant *Hertia cheirifolia* against the most abundant mosquito species, in Algeria. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 258-262.
- Ammar S, Edziri H, Mahjoub MA, Chatter R, Bouraoui A, Mighri Z. (2009). Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*. *Phytomedicine*, 16, 1156–1161.
- Amraoui N, Mayouf N, Charef N, Baghiani A, Arrar L. (2019). Antioxidant, anti-inflammatory and anti-arthritic activities of methanol extract of *Tamus communis* L. roots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18 (7) : 1499-1506.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183-98.
- Aouachria S, Boumerfeg S, Benslama A, Benbacha F, Guemmez T, Khennouf S, Arrar L, Baghiani, A. (2017). Acute, sub-acute toxicity and antioxidant activities (in vitro and in vivo) of *Reichardia picroide* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 208, 105-116.
- Aratani Y. (2018). Myeloperoxidase : Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 640, 47-52.
- Araújo VMA, Melo IM, Lima V. (2015). Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis : Review of the Literature. *Mediators of Inflammation*, Article ID 259074, 15 pages.
- Armutcu F, Akyol S, Ustunsoy S, Turan FF. (2015). Therapeutic potential of caffeic acid phenethyl ester and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9, 1582-1588.
- Arnhold J. (2020). The dual role of myeloperoxidase in immune response. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 8057.
- Arrar L, Benzidane N, Krache I, Charef N, Khennouf, S, Baghiani A. (2013). Comparison between polyphenol contents and antioxidant activities of different parts of *Capparis spinosa* L. *Pharmacognosy Communications*, 3, 70-74.
- Arrar L, Diafet A, Charef N, Khennouf S, Baghiani A. (2013). Preventive and curative effect of the methanolic extract of *Ajuga iva* on collagen induced arthritis in rats. *Pharmacognosy Communications*, 3(2), 17-23.
- Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. (2012). Inflammation : mechanisms, costs, and natural variation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43:1, 385-406.
- Astry B, Venkatesha SH, Laurence A, Christensen-Quick A, Garzino-Demo A, et al. (2015). Celastrol, a Chinese herbal compound, controls autoimmune inflammation by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells in the target organ. *Clinical Immunology*, 157, 228-238.

- Attia S, Grissa-Lebdi K, Mailleux AC, Heuskin S, Lognay G, Hance T. (2012). Acaricidal activities of *Santolina Africana* and *Hertia cheirifolia* essential oils against the two-spotted spidermite (*Tetranychus urticae*). *Pest Management Science*, 68 (7), 1069-1076.
- Attia S, Grissa-Lebdi K, Heuskin S, Lognay G, Hance T. (2015). An analysis of potential resistance of the phytophagous mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) to four botanical pesticides. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 19(3), 232-238.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. (2014). Lipid peroxidation : production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 360438, 31 pages.
- Babich H, Schuck AG, Weisburg JH, Zuckerbraun HL. (2011). Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. *Journal of Toxicology*, Volume 2011, Article ID 467305, 12 pages.
- Balandraud N, Roudier J. (2018). Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 85(2) :165-170.
- Balbir-Gurman A, Fuhrman B, Braun-Moscovici Y, Markovits D, Aviram M. (2011). Consumption of pomegranate decreases serum oxidative stress and reduces disease activity in patients with active rheumatoid arthritis : a pilot study. *The Israel Medical Association Journal*, 13:474-9.
- Bendary E, Francis RR, Sarwat MI, El Hady S. (2013). Antioxidant and structure-activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compound. *Annals of Agriculture Sciences*, 58(2) ,173-181.
- Beniston NT, Beniston WS. (1984). *Fleurs d'Algérie*. Ed. ENAL, Alger.
- Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. (2010). Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis : how does it relate to rheumatoid arthritis ? *Arthritis Rheumatism*. 62, 2192-2205.
- Billiau A, Matthys P. (2001). Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of auto-immune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, 70 (6), 849-860.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.
- Biswas SK. (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox ? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 5698931, 9 pages.
- Bitencourt CS, Bessi VL, Huynh DN, Ménard L, Lefebvre JS, Lévesque T, Marleau S. (2013) Cooperative role of endogenous leucotrienes and platelet-activating factor in ischaemia–reperfusion-mediated tissue injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 17, 1554-1565.
- Bokare AD, Choi W. (2014). Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 275, 121-135.
- Boora F, Chirisa E, Mukanganyama S. (2014). Evaluation of nitrite radical scavenging properties of selected Zimbabwean plant extracts and their phytoconstituents. *Journal of Food Processing*, Article ID 918018, 7 pages.
- Borhade PS, Dalal PS, Pachauri AD, Lone KD, NA Chaudhari NA, PK Rangari PK. (2012). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Hibiscus tiliaceus* Linn wood extract. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3 (3), 1246-1250.

- Boumerfeg S, Baghiani A, Djarmouni M, Ameni D, Adjadj M, Belkhiri F, Charef N, Khennouf S, Arrar L. (2012). Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. extracts. *Chinese Medicine*, 3, 30-41.
- Bouriche H, Kada S, Assaf AM, Senator A, Gül F, Dimertas I. (2016). Phytochemical screening and anti-inflammatory properties of Algerian *Hertia cheirifolia* methanol extract. *Pharmaceutical Biology*. 54, 2584-2590.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Bravo L. (1998), Polyphenols : Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Review*. 56, 317-333.
- Bunsupa S, Yamazaki M, Saito K. (2017). Lysine-derived alkaloids : overview and update on biosynthesis and medicinal applications with emphasis on quinolizidine alkaloids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(12), 1002-1012.
- Burmester GR, Pop JE. (2017). Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 389(10086), 2338-2348.
- Calvo Alén J, Pérez T, Romero Yuste S, Ferraz-Amaro I, Alegre Sancho JJ, et al. (2018). Efficacy and safety of combined therapy with synthetic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis : Systematic literature review. *Reumatologia Clinica*. S1699-258X(18)30175-X.
- Cannon GW, Openshaw SJ, Hibbs JB, Hoidal JR, Huecksteadt TP, Griffiths MM. (1996). Nitric oxide production during Adjuvant-Induced and Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis Rheumatism*. 39(10), 1677-1684.
- Casciaro B, Mangiardi L, Cappiello F, Romeo I, Loffredo MR, Iazzetti A, Calcaterra A, Goggiamani A, Ghirga F, Mangoni ML, Botta B, Quaglio D. (2020). Naturally-occurring alkaloids of plant origin as potential antimicrobials against antibiotic-resistant infections. *Molecules*, 25, 3619-3652.
- Castellani P, Balza E, Rubartelli A. (2014). Inflammation, DAMPs, tumor development, and progression : a vicious circle orchestrated by redox signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(7), 1086-1097.
- Cao R, Peng W, Wang Z, Xu A. (2007). β -Carboline alkaloids : biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 479-500.
- Chaillou LL, Nazareno MA. (2006). New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8397-402.
- Chandran B, Goel A. (2012). A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. *Phytotherapy Research*, 26, 1719-1725.
- Chang HH, Liu GY, Dwivedi N, Sun B, Okamoto Y, Kinslow JD, et al. (2016). A molecular signature of preclinical rheumatoid arthritis triggered by dysregulated PTPN22. *JCI Insight*. 1(17), e90045.
- Charles DJ. (2013). *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. Springer, New York, NY, USA. p. 612.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204-7218.

- Chermat S, Gharzouli R. (2015). Ethnobotanical Study of Medicinal Flora in the North East of Algeria - An Empirical Knowledge in Djebel Zdimm (Setif). *Materials Science and Engineering A*, 5, 50-59.
- Chirinos R, Betalleluz-Pallardel I, Huamán A, Arbizu C, Pedreschi R, Campos D. (2009). HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 113, 1243-1251.
- Chiva-Blanch G, Visioli F. (2012). Polyphenols and health : moving beyond antioxidants. *Journal of Berry Research*, 2, 63-71.
- Choudhary M, Kumar V, Malhotra H, Singh S. (2015). Medicinal plants with potential antiarthritic activity. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 4(2) : 147-179.
- Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. (2018). Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 40(3), 193-200.
- Connor JR, Manning PT, Settle SL, Moore WM, Jerome GM, Webber RK, Tjoeng FS, Currie MG. (1995). Suppression of adjuvant-induced arthritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology* 273, 15-24.
- Conti F, Ceccarelli F, Massaro L, Cipriano E, Di Franco M, Alessandri C, et al. (2013). Biological therapies in rheumatic diseases. *La clinica terapeutica*, 164 (5), e413-428.
- Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. (2018). The role of polyphenols in human health and food systems : A mini-review. *Frontiers in Nutrition*, 5, 87.
- Cui X, Wang R, Bian P, Wu Q, Seshadri VDD, Liu L. (2019). Evaluation of antiarthritic activity of nimbolide against Freund's adjuvant induced arthritis in rats. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 3391-3398.
- Cutrim CS, Cortez MAS. (2018). A review on polyphenols : Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 564-578.
- Dangles O. (2012). Antioxidant activity of plant phenols : chemical mechanisms and biological significance. *Current Organic Chemistry*, 16(6), 692-714.
- da Silva JM, Mota Conegundes JL, Freitas Mendesa R, de Castro Campos Pintoa N, et al. (2015). Topical application of the hexane fraction of *Lacistema pubescens* reduces skin inflammation and cytokine production in animal model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67, 1613-1622.
- da Silva MFGF, Fernandes JB, Forim MR, Vieira PC, de Sá ICG. (2013). Alkaloids Derived from anthranilic acid : quinoline, acridone, and quinazoline. In *Natural Products*. Eds. Ramawat K, and Mérillon JM. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Deane KD, El-Gabalawy H. (2014). Pathogenesis and prevention of rheumatic disease : focus on preclinical RA and SLE. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(4), 212-28.
- Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM. (2017). Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 31(1), 3-18.
- Demoruelle MK, Deane KD, Holers VM. (2014). When and where does inflammation begin in rheumatoid arthritis ? *Current Opinion in Rheumatology*, 26(1), 64-71.
- Dhawan D, Gupta J. (2017). Comparison of different solvents for phytochemical extraction potential from datura metel plant leaves. *International Journal of Biological Chemistry*, 11 (1), 17-22.

- Dhingra AK, Chopra B, Bonthagarala B. (2018). Natural anti-inflammatory agents : recent progress and future perspectives. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, 3(5), 1-11.
- Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. (1971). Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *Journal of pathology*, 104(1), 15-29.
- Di rosa M. (1972). Biological properties of carrageenan. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 24, 89-102.
- Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. (2012). *Free Radical Research*, 46(4), 382-419.
- Dong M, Yu D, Al-Dhabi NA, Duraipandiyan V. (2017). The impacts of *Chrysanthemum indicum* extract on oxidative stress and inflammatory responses in Adjuvant-Induced Arthritic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 3285394, 7 pages.
- Du J, Cullen JJ, Buettner GR. (2012). Ascorbic acid : chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1826(2), 443-457.
- Dudics S, Langan D, Meka RR, Venkatesha SH, Berman BM, Che C-T, Moudgil KD. (2018). Natural products for the treatment of autoimmune arthritis : their mechanisms of action, targeted delivery, and interplay with the host microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), E2508.
- Dunkelberger JR, Song WC. (2010). Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*, 20, 34-50.
- Eddouks M, Chattopadhyay D, Zeggwagh NA. (2012). Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 142087, 14 pages.
- Eghbaliferiz S, Iranshahi M. (2016). Prooxidant activity of polyphenols, flavonoids, anthocyanins and carotenoids : updated review of mechanisms and catalyzing metals. *Phytotherapy Research*, 30, 1379-1391.
- El-Barbary AM, Abdel Khalek MA, Elsalawy AM, Hazaa SM. (2011). Assessment of lipid peroxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *The Egyptian Rheumatologist*, 33, 179-185.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM. (2007). Inflammation in wound repair : Molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 514-525.
- Facchini PJ. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants : Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Biology*, 52, 29-66.
- Farell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. (1992). Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 51(11), 1219-22.
- Ferraccioli G, Bracci-Laudiero L, Alivernini S, Gremese E, Toluoso B, de Benedetti F. (2010). Interleukin-1 β and interleukin-6 in arthritis animal models : roles in the early phase of transition from acute to chronic inflammation and relevance for human rheumatoid arthritis. *Molecular Medicine*, 16 (11-12), 552-557.

- Ferrai M., Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, et al. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 416, 123-129.
- Fernandes I, Faria A, Calhau C, Freitas V, Mateus N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of functional foods*, 7, 54-66.
- Fernández-Llanio CN, Fernández MN, Castellano CJA. (2016). Have complementary therapies demonstrated effectiveness in rheumatoid arthritis ? *Reumatología Clínica*, 12(3) ,151-7.
- Fiedor J, Burda K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6, 466-488.
- Fikry EM, Gad AM, Eid AH, Arab HH. (2019). Caffeic acid and ellagic acid ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats via targeting inflammatory signals, chitinase-3-like protein-1 and angiogenesis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 110, 878-886.
- Firestein G, McInnes IB. (2017). Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*, 46(2), 183-196.
- Fletcher DS, Widmer WR, Luell S, Christen A, Orevillo C, Shah S, Visco D. (1998). Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with Adjuvant-Induced Arthritis in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284 (2), 714-721.
- Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, Tomás-Barberán FA. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food and Function*, 10(2), 514-528.
- Frisell T, Saevarsdottir S, Askling J. (2016). Family history of rheumatoid arthritis : an old concept with new developments. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(6), 335-43.
- Fukumoto LR, Mazza G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597-3604.
- Gan JT. (2010). Diclofenac : an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*, 26(7), 1715-1731.
- Gan RW, Bemis EA, Demoruelle MK, Striebich CC, Brake S, Feser ML, Moss L, et al. (2017). The association between omega-3 fatty acid biomarkers and inflammatory arthritis in an anti-citrullinated protein antibody positive population. *Rheumatology*, 56, 2229-2236.
- Gaweł S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomości Lekarskie*, 57(9-10), 453-5.
- George A, Chinnappan S, Chintamaneni M, Kotak CV, Choudhary Y, et al. (2014). Anti-inflammatory effects of *Polygonum minus* (Huds) extract (Lineminus™) in in-vitro enzyme assays and carrageenan induced paw edema. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 355.
- Gioxari A, Kaliora AC, Marantidou F, Panagiotakos DP. (2018). Intake of ω -3 polyunsaturated fatty acids in patients with rheumatoid arthritis : A systematic review and meta-analysis. *Nutrition*, 45, 114-124.
- Gonçalves GA, Soares AA, Correa RCG, Lillian Barros L, Haminiuk CWI, Peralta RM, Ferreira ICFR, Bracht A. (2017). Merlot grape pomace hydroalcoholic extract improves the oxidative and inflammatory states of rats with adjuvant-induced arthritis. *Journal of Functional Foods*, 33, 408-418.

- Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia S, Juarez-Pomblum J, da Silva JBT, Farina M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Química Nova*, 32(1), 169-174.
- Guemmaz T, Zerargui F, Boumerfeg S, Arrar L, Aouachria S, Khennouf S, Charef N, Baghiani A. (2018). Anti-hemolytic, anti-lipid peroxidation, antioxidant properties and acute toxicity of *Xanthium strumarium* leaves extracts. *Annual Research and Review in Biology*, 24(3), 1-12.
- Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães MCC, Endringer DC, et al. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24(13), 2471.
- Gülçin I, Huyut Z, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian journal of chemistry*, 3(1), 43-53.
- Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J. (2018). Rheumatoid arthritis : pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Research*, 6, 15.
- Halliwell B. (2006). Phagocyte-derived reactive species : salvation or suicide ? *Trends in Biochemical Sciences*. 31, 509-515.
- Halliwell B. (2013). The antioxidant paradox : less paradoxical now ? *British journal of clinical pharmacology*, 75(3), 637-644.
- Hajibabaei K. (2016). Antioxidant properties of vitamin E. *Annals of research in antioxidants*, 1(2), e22.
- Hamid HA, Ramli ANM, Yusoff MM. (2017). Indole alkaloids from plants as potential leads for antidepressant drugs : A mini review. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 96.
- Hanna VS, Hafez EA. (2018). Synopsis of arachidonic acid metabolism : A review. *Journal of advanced research*, 11, 23-32.
- Hardbower DM, de Sablet Th, Chaturvedi R, Wilson KT. (2013). Chronic inflammation and oxidative stress. *Gut Microbes*, 4(6), 475-481.
- Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, et al. (2012). Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest*, 122(5), 1791-802.
- Hasan H, Ismail H, El-Orfali Y, Khawaj Gh. (2018). Therapeutic benefits of Indole-3-Carbinol in adjuvant-induced arthritis and its protective effect against methotrexate induced hepatic toxicity. *Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 337-348.
- He J, Wang Y, Feng M, Zhang X, Jin YB, Li X, Su LC, Liu S, Wang AX, et al. (2016). Dietary intake and risk of rheumatoid arthritis-a cross section multicenter study. *Clinical Rheumatology*, 35(12), 2901-8.
- Headland SE, Norling LV. (2015). The resolution of inflammation : Principles and challenges. *Seminars in Immunology*. 27, 149-160.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-84.
- Hemshekhar M, Sebastin Santhosh M, Sunitha K, Thushara RM, Kemparaju K, Rangappa KS, et al. (2012). A dietary colorant crocin mitigates arthritis and associated secondary complications by modulating cartilage deteriorating enzymes, inflammatory mediators and antioxidant status. *Biochimie*, 94(12) : 2723-2733.

- Herman A, Herman AP. (2013). Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. *Skin Pharmacology and Physiology*, 26, 8-14.
- Hirata T, Narumiya S. (2012). Prostanoids as regulators of innate and adaptive immunity. *Advances in Immunology*. 116:143-174.
- Henrotin Y, Kurz B. (2007). Antioxidant to treat osteoarthritis : dream or reality ? *Current Drug Targets*, 8(2), 347-57.
- Hoshino Y, Gaucher EA. (2018). On the origin of isoprenoid biosynthesis. *Molecular Biology and Evolution*, 35(9), 2185-2197.
- Huang D, Boxin O, Prior RL. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Huang MN, Yu H, Moudgil KD. (2010). The involvement of heat-shock proteins in the pathogenesis of autoimmune arthritis : a critical appraisal. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 40(2), 164-175.
- Huang WJ, Zhang X, Chen WW. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review). *Biomedical Reports*, 4, 519-522.
- Hulvova H, Galuszka P, Frebortova J, Frebort. (2013). Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnology Advances*, 31, 79-89.
- Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. (2016). Oxidative stress and inflammation : what polyphenols can do for us ? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 4, 1-9.
- Ilic NM, Dey M, Poulev AA, Logendra S, Peter E, Kuhn PE, Raskin I. (2014). Anti-inflammatory activity of grains of paradise (*Aframomum melegueta* Schum) Extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 10452-10457.
- Iloki-Assanga SB, Lewis-Lujan LM, Lara-Espinoza CL, Gil-Salido AA, et al. (2015). Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Research Notes*, 8, 396.
- Islam MA, Alam F, Solayman M, Khalil MI, Kamal MA and Gan SH. (2016). Dietary phytochemicals : natural words combating inflammation and oxidation-mediated degenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 5137431.
- Ito F, Sono Y, Ito T. (2019). Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress : oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. *Antioxidants*, 8, 72.
- Jang D, Murell GAC. (1998). Nitric oxide in arthritis. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1511-1519.
- Jazayeri JA, Carroll GJ, Vernallis AB. (2010). Interleukin-6 subfamily cytokines and rheumatoid arthritis : role of antagonists. *International Immunopharmacology*, 10(1), 1-8.
- Jha JC, Ho F, Dan C, Jandeleit-Dahm K. (2018). A causal link between oxidative stress and inflammation in cardiovascular and renal complications of diabetes. *Clinical Science*, 132(16) :1811-1836.

- Jin T, Xu X, Hereld D. (2008). Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine* 44, 1-8.
- Jitta SR, Daram P, Gourishetti K, Misra CS, Polu PR, Shah A, Shreedhara CS, Madhavan Nampoothiri M, Lobo R. (2019). *Terminalia tomentosa* bark ameliorates inflammation and arthritis in carrageenan induced inflammatory model and Freund's Adjuvant-Induced Arthritis model in rats. *Journal of Toxicology*, Article ID 7898914, 11 pages.
- Johnson M, Bradford Ch. (2014). Omega-3, Omega-6 and Omega-9 fatty acids : Implications for cardiovascular and other diseases. *Journal of Glycomics and Lipidomics*, 4(4), 123-131.
- Kada S, Bouriche H, Senator A, Demirtas I, Özen T, Toptanci BC, Kızıld G, Kızıld M. (2016). Protective activity of *Hertia cheirifolia* extracts against DNA damage, lipid peroxidation and protein oxidation. *Pharmaceutical Biology*, 55, 330-337.
- Kalinowska M, Bielawska A, Lewandowska-Siwkiewicz H, Priebe W, Lewandowski W. (2014). Apples : content of phenolic compounds vs variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84, 169-188.
- Kandati V, Govardhan P, Reddy CHS, Nath AR 5, Reddy RR. (2012). In-vitro and in-vivo anti-inflammatory activity of *Andrographis serpyllifolia* (Rottl. Ex Vahl.) Wt. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(8), 199-204.
- Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. (2005). Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*, 12, 167-181.
- Kapoor B, Gupta R, Gupta M. (2017). Natural products in treatment of rheumatoid arthritis. *International Journal of Green Pharmacy*, 11, S356-S363.
- Kadhim MJ, Hameed IH, Kaizal AF. (2016). Medicinal plants used for treatment of rheumatoid arthritis : A review. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(12), 1685-1694.
- Karim N, Khan I, Khan W, Khan I, Khan A, Halim SA, Khan H, Hussain J, Al-Harrasi A (2019) Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of asparacosin A involve selective cyclooxygenase 2 and inflammatory cytokines inhibition : An in-vitro, in-vivo, and in-silico approach. *Frontiers in Immunology*, 10:581.
- Katerova Z, Todorova D, Tasheva K, Sergiev I. (2012). Influence of ultraviolet radiation on plant secondary metabolite production. *Genetics and plant physiology*, 2 (3-4), 113-144.
- Kato Y. (2016). Neutrophil myeloperoxidase and its substrates : formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 58(2), 99-104.
- Kaur A, Arora S. (2015). Alkaloids-important therapeutic secondary metabolites of plant origin. *Journal of critical reviews*, 2(3), 1-8.
- Kaur A, Nain P, Nain J. (2012). Herbal plants used in treatment of rheumatoid arthritis : A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (S4), 44-57.
- Kelly EH, Anthony RT, Dennis JB. (2002). Flavonoid antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Kelly V, Genovese M. (2013). Novel small molecule therapeutics in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 52 (7) : 1155-1162.

- Khadem MAH. (2016). Anti-arthritic activity of ethanolic extract of *Lawsonia inermis* in Freund's adjuvant induced arthritic rats. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 9(6) :2319e72.
- Khan FA, Maalik A, Murtaza G. (2016). Inhibitory mechanism against oxidative stress of caffeic acid. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(4), 695-702.
- Khan AA, Alsahli MA, Rahmani AH. (2018). Myeloperoxidase as an active disease biomarker : recent biochemical and pathological perspectives. *Medical Sciences*, 6(2), 33.
- Khorsan R, Crawford C, Ives JA, Walter AR, Jonas WB. (2014). The effect of omega-3 fatty acids on biomarkers of inflammation : A rapid evidence assessment of the literature. *Military Medicine*, 179(11 Suppl), 2-60.
- Kim YG, Park HY. (2004). The effects of Pycnogenol on DNA damage *in vitro* and expression of superoxide dismutase and HP1 in *Escherichia coli*. SOD and catalase deficient mutant cells. *Phytotherapy Research*, 18(11) 900-905.
- Kim EY, Durai M, Mia Y, Kim HR, Moudgil KD. (2016). Modulation of Adjuvant Arthritis by Cellular and Humoral Immunity to Hsp65. *Frontiers in Immunology*, 7, 203.
- Kim J, Choe E. (2018). Effect of the pH on the lipid oxidation and polyphenols of soybean oil-in-water emulsion with added peppermint (*Mentha piperita*) extract in the presence and absence of iron. *Food Science and Biotechnology*, 27(5): 1285-1292.
- Klebanoff SJ. (2005). Myeloperoxidase : friend and foe. *The Journal of Leukocyte Biology*, 77, 598-625.
- Kloesch B, Becker T, Dietersdorfer E, Kiener H, Steiner G. (2013). Anti-inflammatory and apoptotic effects of the polyphenol curcumin on human fibroblast-like synoviocytes. *International Immunopharmacology*, 15, 400-405.
- Knaggs AR. (2001). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 18, 334-355.
- Kohnen-Johannsen KL, Kayser O. (2019). Tropane Alkaloids : chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. *Molecules*, 24(4), E796.
- Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervordeldonc MJ, Holmadahi R, Baumans V, et al. (2011). Animal models for arthritis : innovative tools for prevention and treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(8), 1357-1362.
- Konig MF, Paracha AS, Moni M, Bingham CO, Andrade F. (2015). Defining the role of *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase (PPAD) in rheumatoid arthritis through the study of PPAD biology. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(11), 2054-2061.
- Kotas ME, Medzhitov R. (2015). Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell*, 160(5), 816-827.
- Koziel J, Mydel P, Potempa J. (2014). The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis : an updated review. *Current Rheumatology Reports*, 16(3), 408.
- Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JAM, Willems PHGM. (2010). Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxidant and Redox Signaling*, 12(12), 1431-1470.
- Krinsky NI, Johnson EJ. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459-516.

- Kshirsagar AD, Panchal PV, Harle UN, Nanda RK, Shaikh HM. (2014). Anti-inflammatory and antiarthritic activity of anthraquinone derivatives in rodents. *International Journal of Inflammation*, Article ID 690596, 12 pages.
- Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dimitriev AA, Alekseev BY, Kardymon OL, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Pokrovsky AV, et al. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, 7(29), 44879-44905.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC, and Robbins SL. (2012). Inflammation and repair. *Robbins Basic Pathology*. Saunders, Philadelphia, London. p 29-74.
- Kumar P, Banik S. (2013). Pharmacotherapy options in rheumatoid arthritis. *Clinical Medicine Insights : Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, 6:35-43.
- Kumar S, Pandey AK. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids : an overview. *The scientific world journal*, Article ID162750, 16 pages.
- Kumar S, Pandey AK. (2015). Free radicals : health implications and the irmitigation by herbals. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 7(6), 438-457.
- Kumar V, Khan AA, Tripathi A, Dixit PK, Bajaj UK. (2015). Role of oxidative stress in various diseases : Relevance of dietary antioxidants. *The Journal of Phytopharmacology*, 4(2), 126-132.
- Kunsch C, Sikorski JA, Sundell CL. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants for the treatment of Rheumatoid Arthritis. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, 5, 249-258.
- Kuo CF, Grainge MJ, Valdes AM, See LC, Yu KH, Shaw SWS, Luo SF, Zhang W, Doherty M. (2017). Familial aggregation of rheumatoid arthritis and co-aggregation of autoimmune diseases in affected families : a nationwide population-based study. *Rheumatology*, 56, 928-933.
- La Cava A. (2017). Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine*, 98, 51-58.
- Lawrence T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a001651.
- Lawrence T, Fong C. (2010). The resolution of inflammation : anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(4), 519-23.
- Lee YH, Bae SC, Song GG. (2012). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and the treatment of rheumatoid arthritis : a meta-analysis. *Archives of Medical Research*, 43,356-62.
- Li S, Lo CY, Pan MH, Lai CS, Ho CT. (2013). Black tea : Chemical analysis and stability. *Food and Function*, 4, 10-8.
- Li S, Hong M, Tan HY, Wang N, Feng Y. (2016). Insights into the role and interdependence of oxidative stress and inflammation in liver diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 4234061, 21 pages.
- Li J, Lan T, Zhang C, Hou J, Yang Z, Zhang M, Liu J, Liu B. (2015). Reciprocal activation between IL- 6/STAT3 and NOX4/Akt signalings promotes proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*, 6(2), 1031–1048.
- Liang N, Kitts DD. (2016). Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. *Nutrients*, 8, 16.
- Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, et al. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13, 757-772.

- Lind M, Hayes A, Caprnda M, Petrovic D, Rodrigo L, Kruzliak P, Zulli A. (2017). Inducible nitric oxide synthase : good or bad ? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, 370-375.
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17023.
- Liu X, Zeng B, Zhang J, Li W, Mou F, Wang H, Zou Q, Zhong B, Wu L, et al. (2016). Role of the gut microbiome in modulating arthritis progression in mice. *Scientific Reports*, 6, 30594.
- Liu Y, Guo M. 2015. Studies on transition metal-quercetin complexes using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Molecules*, 20(5), 8583-94.
- Lopusna K, Rezuchova I, Betakova T, Skovranova L, Tomaskova J, Lukacikova L, Kabat P. (2013) Interferons lambda, new cytokines with antiviral activity. *Acta virologica*, 57, 171-179.
- Lubbers R, van Essen MF, van Kooten C, Trouw LA. (2017). Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical and Experimental Immunology*. 188, 183-194.
- Ludwiczuk A, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI. (2017). Terpenoids. In *Pharmacognosy. Fundamentals, applications and strategies*. pp, 233-266. Badal S and Delgoda R (Eds.).
- Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Journal of Biological Chemistry*, 395(2), 203-230.
- Luscinskas FW, Leick M, Newton G, Nusra A. (2015). Introduction for the special issue on tissue barriers in Inflammation. *Issue Barriers*, 3(1-2) : e1015825.
- Mbiantcha M, Almas J, Shabana SU, Nida D, Aisha F. (2017). Anti-arthritic property of crude extracts of *Piptadeniastrum africanum* (Mimosaceae) in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *BMC Complementary and Alternative Médecine*, 17, 111.
- Massiot G, Nuzilliard JM, Le Men-Olivier Louise, Aclinou P, Benkouider A, Khelifa A. Eremephilenolides from *Hertia cheirifolia*. *Phytochemistry*, 1990; 29(7): 2207-2210.
- Mnaimneh S, Damaj M, Barhoumi R, Mouneimne Y, Geffard M, Veyret B, Vincendeau P. (2004). Evidence for nitric oxide involvement in experimental autoimmune encephalomyelitis and adjuvant-induced arthritis in Lewis rat. *The Pain Clinic*, 16 (3), 229-243.
- Majouli K, Hlila MB, Hamdi A, Flamini G, Ben Jannet H, Kenani A. (2016a). Antioxidant activity and α -glucosidase inhibition by essential oils from *Hertia cheirifolia* (L.). *Industrial crops and products*, 82, 23-28.
- Majouli K, Hlila MB, Flamini G, Ben Jannet H, Kenani A. (2016b). In vitro antibacterial activity of the *Hertia cheirifolia* L. essential oils. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(11), 865-867.
- Majouli K, Hamdi A, Msaada K, Kenani A. (2017a). A bioactivity guided study on the antibacterial activity of *Hertia cheirifolia* L. extracts. *Microbial Pathogenesis*, 106, 113-118.
- Majouli K, Mahjoub MA, Rahim F, Hamdi A, Wadood A, Hlila MB, Kenani A. (2017b). Biological properties of *Hertia cheirifolia* L. flower extracts and effect of the nopol on α -glucosidase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 757-761.
- Majouli K, Hamdi A, Besbes Hlila M. (2017c). Phytochemical analysis and biological activities of *Hertia cheirifolia* L. roots extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(12), 1134-1139.

- Majouli K, Hamdi A, Abdelhamid A, Bouraoui A, Kenani A. (2018a). Anti-inflammatory activity and gastroprotective effect of *Hertia cheirifolia* L. roots extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 217, 7-10.
- Majouli K, Hlila MB, Hamdi A, Kenani A. (2018b). Phytochemical and pharmacological properties of *Hertia* L. genus. *SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 1-3.
- Malekzadeh N. (2017). Current treatment in rheumatoid arthritis : a review including nanotechnology and gene therapy. *Review in clinical medicine*, 4(2), 62-68.
- Malmstrom V, Catrina AI, Klareskog L. (2017). The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis : from triggering to targeting. *Nature Reviews Immunology*, 17, 60-75.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. (2004). Polyphenols : Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Manisha N, Whidul H, Richa R, Deepali J. (2017). Oxidative stress and antioxidants : An overview. *International Journal of Advanced Research and Review*, 2(9), 110-119.
- Mashima R, Okuyama T (2015) The role of lipoxygenases in pathophysiology ; new insights and future perspectives. *Redox Biology*, 6, 297-310.
- Maru GB, Kumar G, Ghantasala S, Tajpara P. (2014). Chapter 87 - Polyphenol-mediated in vivo cellular responses during carcinogenesis, 2, 1141-1179. In *Polyphenol in human health and disease*. Ed. Watson RR, Victor R. Preedy VR and Zibadi S.
- Mavar-Manga H, Haddad M, Pieters L, Baccelli C, Penge A, Quetin-Leclercq J. (2008). Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(1), 25-9.
- Mayouf N, Charef N, Saoudi S, Baghiani A, Khennouf S, Arrar L. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Asphodelus microcarpus* methanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 239, Article 111914.
- McInnes IB, Schett G. (2011). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine*, 365, 2205-2219.
- McInnes IB, Schett G. (2017). Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*, 389:2328-2337.
- McNamee K, Williams R, Seed M. (2015). Animal models of rheumatoid arthritis : how informative are they ? *European Journal of Pharmacology*, 759, 278-286.
- Medzhitov Z. (2010). Inflammation 2010 : new adventures of an old flame. *Cell*, 140(6), 771-6.
- Meng, W. Zhu Z, Jiang X, Too CL, Uebe S, Jagodic M, Kockum I, Murad S, et al. (2017). DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 19(1), 71.
- Metcalfe DD, Pawankar R, Ackerman SJ et al. (2016). Biomarkers of the involvement of mast cells, basophils and eosinophils in asthma and allergic diseases. *World Allergy Organ J*, 9(7).
- Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florêncio MH, Jennings KR. (2002). Interactions of flavonoids with iron and copper ions : a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*, 36(11), 1199-208.
- Mishra A, Kumar S, Pandey AK. (2013). Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospor acordifolia*. *The Scientific World Journal*, Article ID 292934, 8 pages.

- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants and redox signaling*, 20(7), 1126–1167.
- Mohamed S. (2014). Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends in Food Science and Technology*, 35, 114-128.
- Mokhnache K, Madoui S, Khither H, Soltani E, Charef N, Arrar L. (2019). Synthesis, characterization, hydrolytic cleavage, and biological activity studies of 2-[(1e)-N-{2-[(2-{(Z)-[1-(2-hydroxyphenyl) ethylidene] amino}ethyl) amino]ethyl} ethanimidoyl] phenol. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 25-29.
- Molyneux P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26 (2), 211-219.
- Monach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. (2004). Polyphenols : food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-47.
- Monach PA, Benoist C, Mathis D. (2004). The role of antibodies in mouse models of rheumatoid arthritis, and relevance to human disease. *Advances in Immunology*, 82, 217-248.
- Moon JK, Shibamoto T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655-1666.
- Mostafa NM. (2017). Comparative Analysis of Rutin Content in Some Egyptian Plants : A Validated RP-HPLC-DAD Approach. *European Journal of Medicinal Plants*. 19, 1-8.
- Mudgal J, Gowdra VS, Mathew G, Nayak PG, Reddy ND, Namdeo N, Kumar RR, Chaitanya Kantamaneni C, Chamallamudi MR, Nampurath GK. (2014). Remedial effects of novel 2,3-disubstituted thiazolidin-4-ones in chemical mediated inflammation. *Chemico-Biological Interactions*, 210, 34-42.
- Muxel SM, Laranjeira-Silva MF, de Carvalho Sousa CE, Floeter-Winter LM, Markus RP. (2016). The RelA/cRel nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) dimer, crucial for inflammation resolution, mediates the transcription of the key enzyme in melatonin synthesis in RAW 264.7 macrophages. *Journal of Pineal Research*, 60(4), 394-404.
- Naczki M, Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Ersek B, Buzas E, Perl A. (2010). Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research and Therapy*, 12(3), 210.
- Nathan C. (2006). Neutrophils and immunity : challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, 6, 173-182.
- Ncube B, J Van Staden J. (2015). Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. *Molecules*, 20, 12698-12731.
- Necas J, Bartosikova L. (2013). Carrageenan : a review. *Veterinarni Medicina*, 58(4), 187-205.
- Neog MK, Pragasam J, Krishnan S, Rasool M. (2017). p-Coumaric acid, a dietary polyphenol ameliorates inflammation and curtails cartilage and bone erosion in the rheumatoid arthritis rat model. *Biofactors*, 43, 698-717.

- Newbould BB. (1963). Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. *British Journal of Pharmacology*, 21, 127-136.
- Noack M, Miossec P. (2017). Selected cytokines pathways in rheumatoid arthritis. *Seminar in immunopathology*, 39, 365-383.
- Nur Alam M, Bristi NJ, Rafiquzzaman M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Odobasic D, Yang Y, Muljadi RCM, O'Sullivan KM, Kao W, Smith M, Morand EF, Holdsworth SR. (2014). Endogenous myeloperoxidase is a mediator of joint inflammation and damage in experimental arthritis. *Arthritis and rheumatology*, 66(4), 907-917.
- Okpo S, Fatokun F, Adeyemi O. (2001). Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 78, 207-211.
- Oliveira-Tintino CDM, Pessoa RT, Fernandes MNM, Alcântara IS, da Silva BAF, et al. (2018). Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the croton campestris A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. *Phytomedicine*, 41, 82-95.
- Oliviero F, Spinella P, Fiocco U, Ramonda R, Sfriso P, Punzi L. (2015). How the Mediterranean diet and some of its components modulate inflammatory pathways in arthritis. *Swiss Medical Weekly*, 145, w14190.
- Oliviero F, Scanu A, Zamudio-Cuevas Y, Punzi L, Spinella P. (2017). Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), 1653-1659.
- Olivoto T, Nardino M, Carvalho IR, Follmann DN, Szareski VJ, Ferrari M, et al. (2017). Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors : A review. *African Journal of Agricultural Research*, 12(2), 71-84.
- Omoba OS, Obafaye RO, Salawu SO, Boligon AA, Athayde ML. (2015). HPLC-DAD Phenolic Characterization and Antioxidant Activities of Ripe and Unripe Sweet Orange Peels. *Antioxidants (Basel)*, 4(3), 498-512.
- Orr C, Sousa E, Boyle DL, Buch MH, Buckley CD, Cañete JD et al. (2017). Synovial tissue research : a state-of-the-art review. *Nature Reviews Rheumatology*, 13, 463-475.
- O'Shea JJ, Schwartz DM, Villarino AV, Gadina M, McInnes IB, Laurence A. (2015). The JAK-STAT pathway : impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual Review of Medicine*. 66, 311-328.
- Osmić S, Begić S, Mičić V. (2019) The Effect of concentration of methanol as a solvent on the antioxidative activity of sage extract. In : Karabegović I. (eds) *New technologies, development and application*. NT 2018. *Lecture notes in networks and systems*, vol. 42. Springer, Cham.
- Ozougwu JC. (2016). The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, 3(6), 1-8.
- Pal R, Manju J. Chaudhary MJ, Prafulla C. Tiwari PC, Babu S, Pant KK. (2015). Protective role of theophylline and their interaction with nitric oxide (NO) in adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *International Immunopharmacology*, 29(2), 854-862.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. (2016). Flavonoids : an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5 (e47), 1-15.

- Pandey KB, Rizvi SI. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5) ; 270-278.
- Pap T, Korb-Pap A. (2015). Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis-two unequal siblings. *Nature Reviews Rheumatology*, 11, 606-615.
- Papageorgiou VP, Assimopoulou AN. (2003). Lipids of the Hexane extract from the roots of medicinal Boraginaceous species. *Phytochemical Analysis*, 14, 251-258.
- Papich MG. (2016). Indomethacin. *Saunders Handbook of Veterinary Drugs*, 396-397.
- Parejo I, Francesc V, Bastida J, Codina C. (2004). Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the analysis of antioxidative phenolic compounds in fennel using a narrow bore reversed phase C18 column. *Analytica Chimica Acta*, 512(2):271-280.
- Park EJ, Pezzuto JM. (2012). Flavonoids in cancer prevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 12(8), 836-51.
- Passos GF, Medeiros R, Marcon R, Nascimento AF, Calixto JB, Pianowski LF. (2013). The role of PKC/ERK1/2 signaling in the anti-inflammatory effect of tetracyclic triterpene euphol on TPA-induced skin inflammation in mice. *European Journal of Pharmacology*, 698, 413-420.
- Patil KR, Patil CR. (2017). Anti-inflammatory activity of bartogenic acid containing fraction of fruits of *Barringtonia racemosa* Roxb. in acute and chronic animal models of inflammation. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7, 86-93.
- Patil KR, Mahajan UB, Unger BS, Goyal SN, Belemkar S, Surana SJ, Ojha S, Patil CR. (2019). Animal models of inflammation for screening of anti-inflammatory drugs : implications for the discovery and development of phytopharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 4367.
- Patel MD, Gowda, S. (2012). In vivo animal models in preclinical evaluation of anti-inflammatory activity -a review. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences*, 1(2), 1-5.
- Pearson CM. (1956). Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Experimental Biology and Medicine*, 91, 95-101.
- Perez-Nievas BG, Serrano-Pozo A. (2018). Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 114.
- Perron NR, Brumaghim JL. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 53(2), 75-100.
- Perron NR, Wang HC, Deguire SN, Jenkins M, Lawson M, Brumaghim JL. (2010). Kinetics of iron oxidation upon polyphenol binding. *Dalton Transactions*, 39(41), 9982-7.
- Phaniendra A, Babu D, Periyasamy JL. (2015). Free radicals : properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11-26.
- Phanse MA, Patil MJ, Abbulu K, Chaudhari PD, Patel B. (2012). In-vivo and in-vitro screening of medicinal plants for their anti-inflammatory activity : an overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), 19-33.
- Picerno V, Ferro F, Adinolfi A, Valentini E, Tani C, Alunn A. (2015). One year in review : the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 33(4), 551-8.
- Pietta PG. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.

- Pisoschi AM, Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress : A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74.
- Poljsak B, Šuput D, Milisav I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants : when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 956792, 11 pages.
- Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 4, 25-39.
- Pottier-Alapetite G. (1981). Flore de la Tunisie. Angiospermes dicotylédones. Apétales-dialypétales. Vol. 1, 1012, Ed. Imprimerie officielle de la République Tunisienne. Tunis.
- Prakken BJ, Roord S, Ronaghy A, Wauben M, Albani S, van Edden W. (2003). Heat shock protein 60 and adjuvant arthritis : a model for T cell regulation in human arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology*, 25(1), 47-63.
- Prame Kumar K, Nicholls AJ, Wong CHY. (2018). Partners in crime : neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease. *Cell and Tissue Research*, 371(3), 551–565.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-23.
- Prousek J. (2007). Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry*, 79, 2325-38.
- Qiu S, Sun H, Zhang AH, Xu HY, Yan GL, Han Y, Wang XJ. (2014). Natural alkaloids : basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(6), 0401-0406.
- Quan L. (2013). Macromolecular nanomedicine of glucocorticoids for the treatment of rheumatoid arthritis. *The Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 4, e126.
- Quezel P, Santa S. (1962-1963) Nouvelle Flore d'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. 2 tomes, Ed. CNRS, Paris, 1170.
- Quiñonez-Flores CM, González-Chávez SA, Del Río Nájera D, Pacheco-Ten C. (2016). Oxidative stress relevance in the pathogenesis of the rheumatoid arthritis : A systematic review. *BioMed Research International*, Article ID 6097417, 14 pages.
- Rajaei E, Mowla K, Ghorbani A, Bahadoram S, Bahadoram M, Dargahi-Malamir M. (2015). The effect of omega-3 fatty acids in patients with active rheumatoid arthritis receiving DMARDs therapy : Double-blind randomized controlled trial. *Global journal of health science*, 8(7), 18-25.
- Ramadan G, Al-Kahtani MA, El-Sayed WM. (2011). Anti-inflammatory and anti-oxidant properties of *Curcuma longa* (turmeric) versus *Zingiber officinale* (ginger) rhizomes in rat adjuvant-induced arthritis. *Inflammation*, 34, 291-301.
- Ramana KV, Srivastava S, Singhal SS. (2013). Lipid peroxidation products in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 583438.
- Rao DS. (2015). Rheumatoid Arthritis (RA) Disease treatment with Rutin Stabilized Nanoparticles. *Austin Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 2(2), 1043.

- Rathi B, Bodhankar S, Mohan V, Thakurdesai P. (2013). Ameliorative effects of a polyphenolic action of cinnamomum zeylanicum L. Bark in animal models of inflammation and arthritis. *Scientia Pharmaceutica*, 81: 567-589.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans CA. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA. (2002). The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 33: 220-235.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- Ridgley LA, Anderson AE, Pratt AG. (2018). What are the dominant cytokines in early rheumatoid arthritis ? *Current Opinion in Rheumatology*, 30(2), 207-214.
- Ríha M, Karlíčková J, Filipický T, Jahodár L, Hrdina R, Mladenka P. (2014). In vitro evaluation of copper chelating properties of flavonoids. *RSC Advances*, 4(62), 32628-38.
- Rosillo MA, Alarcon-de-la-Lastra K, Sanchez-Hidalgo M. (2016). An update of dietary phenolic compounds in prevention and management of rheumatoid arthritis. *Food and Function*, 7(7), 2943-2969.
- Roy A. (2017). A Review on the alkaloids an important therapeutic compound from plants. *International Journal of Plant Biotechnology*, 3(2), 1-9.
- Roy T, Ghosh S. (2013). Animal models of rheumatoid arthritis : correlation and usefulness with human rheumatoid arthritis. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3(8), 6131-6142.
- Ryan GB, Majno G. (1977). Acute inflammation. A review. *The American Journal of Pathology*, 86(1) : 183-276.
- Sadeghi H, Parishani M, Touri MA, Ghavamzadeh M, Barmak MJ, Zarezade V, et al. (2017). Pramipexole reduces inflammation in the experimental animal models of inflammation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 39, 1-7.
- Sanchez-Moreno C, Larrauri Jose A, Saura-Calixto F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- Santos IJM, Leite GO, Costa JGM, Alves RRN, Campos AR, Menezes IRA, et al. (2015). Topical anti-inflammatory activity of oil from *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2015: 140247.
- Satriana S, Supardan MD, Arpi N, Wan Mustapha WA. (2018). Development of methods used in the extraction of avocado oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(1), 1-29.
- Scally SW, Petersen J, Law SC, Dudek NL, Nel HJ, Loh KL, Wijeyewickrema LC, et al. (2013). A molecular basis for the association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 210(12), 2569-82.
- Schett G, Gravallesse E. (2012). Bone erosion in rheumatoid arthritis : mechanisms, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Rheumatology*, 8, 656-664.
- Schramm S, Köhler N, Rozhon W. (2019). Pyrrolizidine alkaloids : biosynthesis, biological activities and occurrence in crop plants. *Molecules*, 24, 498.

- Serhan CN. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503), 92-101.
- Shajib MS, Khan WI. (2015). The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiologica (Oxf)*, 213, 561-574.
- Shah SUA, Jawed H, Awan SI, Anjum S, Simjee SU. (2013). The anti-arthritic and immunomodulatory effects of NHAG : A novel glucosamine analogue in Adjuvant-Induced Arthritis. *BioMed Research International*, Article ID 487610, 13 pages.
- Shang XF, Morris-Natschke SL, Liu YQ, Guo X, Xu XS, Goto M, Li JC, Yang GZ, Lee KH. (2018). Biologically active quinoline and quinazoline alkaloids part I. *Medicinal Research Reviews*, 38(3), 775-828.
- Sharma P, Sharma PK, Mishra VB, Akanksha B. (2014). Source, chemistry, metabolism, physiological function : ascorbic acid with human health. *Journal of drug delivery and therapeutics*, 4(5), 74-78.
- Shiomi A, Isui T. (2015). Pivotal roles of GM-CSF in autoimmunity and inflammation. *Mediators of Inflammation*, 568543.
- Shitan N. (2016). Secondary metabolites in plants : transport and self-tolerance mechanisms. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(7), 1283-1293.
- Silva T, Oliveira C, Borges F. (2014). Caffeic acid derivatives, analogs and applications : a patent review (2009-2013).
- Singh B, Sharma RA. (2015). Plant terpenes : defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech*, 5, 129-151.
- Singh DP, Verma S, Prabha R. (2018). Investigations on antioxidant potential of phenolic acids and flavonoids : The common phytochemical ingredients in plants. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 6, 3.
- Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. (2016). *Lancet*, 388(10055), 2023-38.
- Sobral MV, Xavier AL, Lima TC, de Sousa DP. (2014). Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *Scientific World Journal*, Article ID 953451, 35 pages.
- Song GG, Bae S-C, Lee YH. (2012). Association between vitamin D intake and the risk of rheumatoid arthritis : a meta-analysis. *Clinical Rheumatology*, 31, 1733.
- Stanley PL, Steiner S, Havens M, Tramposch KM. (1991). Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacology and Physiology*, 4(4), 262-71.
- Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, Winyard PG, Kettle AJ. (2012). Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 51(10), 1796-803.
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD. (2010). IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S73-S80.
- Su J-Y, Li Q-C, Zhu L. (2011). Evaluation of the in vivo anti-inflammatory activity of a flavone glycoside from *Cancrinia discoidea* (Ledeb.) Poljak *Excli Journal*, 10, 110-116.
- Sugimoto MA, Sousa LP, Pinho V, Pretti M, Teixeira MM. (2016). Resolution of Inflammation : What Controls Its Onset ? *Frontiers in Immunology*, 7, 160.

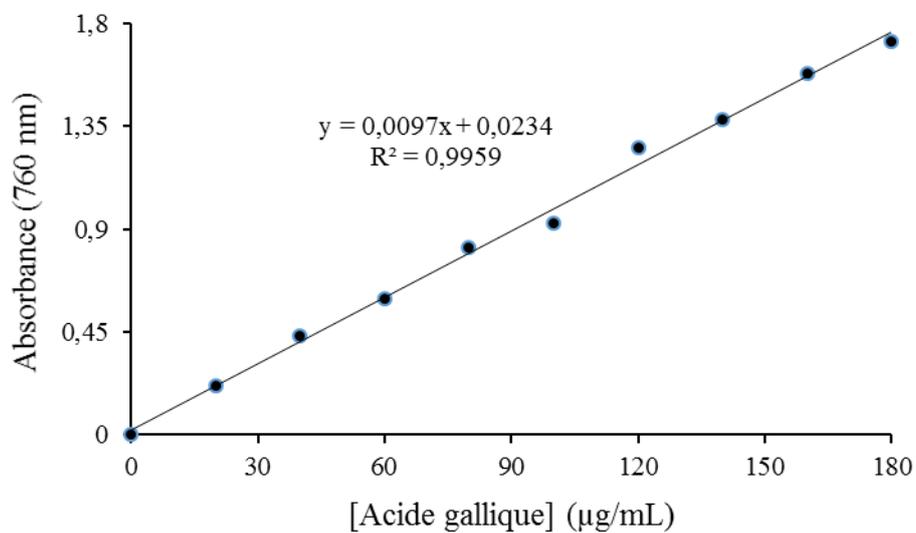
- Suleiman RK, Abu Zarga M, Sabri SS. (2010). New withanolides from *Mandragora officinarum* : First report of withanolides from the Genus *Mandragora*. *Fitoterapia*, 81(7), 864-868.
- Sülsen VP, Lizarraga E, Mamadaliyeva NZ, Lago JHG. (2017). Potential of terpenoids and flavonoids from Asteraceae as anti-inflammatory, antitumor, and antiparasitic agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 6196198, 2 pages.
- Sun CL, Wei J, Bi LQ. (2017). Rutin attenuates oxidative stress and proinflammatory cytokine level in adjuvant induced rheumatoid arthritis via inhibition of NF- κ B. *Pharmacology*, 100, 40-49.
- Sun B, Vaughan D, Tikunova S, Creamer TP, Davis JP, Kekenes-Huskey PM. (2019). Calmodulin-calcineurin interaction beyond the calmodulin-binding region contributes to calcineurin activation. *Biochemistry*, 58(39), 4070-4085.
- Sung S, Kwon D, Um E, Kim B. (2019). Could Polyphenols Help in the Control of Rheumatoid Arthritis ? *Molecules*, 24, 1589.
- Suresh P, Kavitha CHN, Babu SM, Reddy VP, Latha AK. (2012). Effect of ethanol extract of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) seeds on Freund's Adjuvant-Induced Aathritis in albino rats. *Inflammation*, 35(4), 1314-21.
- Sweta VR, Lakshmi T. (2015). Pharmacological profile of tropane alkaloids. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(5), 117-119.
- Taiz L, Zeiger E. (2010). *Plant Physiology*. 6th Edition, Sinauer Associates, Sunderland.
- Taofiq O, González-Paramás AM, Barreiro MF, Ferreira ICFR. (2017). Hydroxycinnamic acids and their derivatives : cosmeceutical significance, challenges and future Perspectives, a review. *Molecules*, 22, 281-304.
- Tholl D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148, 63-106.
- Thouri A, Chahdoura H, El Arem A, Omri Hichri A, Ben Hassin R, Achour L. (2017). Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 248.
- Tiwari R, Rana CS. (2015). Plant secondary metabolites : a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.
- Trabsa H, Krach I, Boussoulim N, Ouhida S, Arrar L, Baghiani A. (2020). Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Sedum sediforme* extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 19 (10), 2109-2114.
- Trentham DE, Townes AS, Kang AH. (1977). Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *Journal of Experimental Medicine*, 146, 857-68.
- Truong DH, Nguyen DH, Anh Ta NT, Bui AV, Ha Do T, Nguyen Ch. (2019). Evaluation of the use of different solvents for phytochemical constituents, antioxidants, and *in vitro* anti-inflammatory activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*, Article ID 8178294, 9 pages.
- Tsao R, McCallum J. (2009). Chemistry of flavonoids. In *fruit and vegetable phytochemicals : chemistry, nutritional value and stability* ; de la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar G. Eds. Blackwell Publishing : Ames, IA, USA, Chapter 5, pp. 131-153.

- Tsikakos D, Suchy MT, Niemann J, Tossios P, Schneider Y, Rothmann S, Gutzki FM, Frölich JC, Stichtenoth DO. (2012). Glutathione promotes prostaglandin H synthase (cyclooxygenase)-dependent formation of malondialdehyde and 15(S)-8-iso-prostaglandin F2a. *FEBS Letters*, 586(20), 3723-3730.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. (2014). Cytokines and chemokines : At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1843, 2563-2582.
- Valin A, Pablos JL. (2015). The role of the transcriptional regulation of stromal cells in chronic inflammation. *Biomolecules*, 5, 2723-57.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1-40.
- Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. (2009). Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 12: 29-33.
- Vassallo R, Luckey D, Behrens M, Madden B, Luthra H, David C, Taneja V. (2014). Cellular and humoral immunity in arthritis are profoundly influenced by the interaction between cigarette smoke effects and host HLA-DR and DQ genes. *Clinical Immunology*, 152(1-2), 25-35.
- Veihelmann A, Hofbauer A, Krombach F, Dorger M, Maier M, Refior HJ, Messmer K. (2002). Differential function of nitric oxide in murine antigen-induced arthritis. *Rheumatology*, 41(5), 509-517.
- Velikova T, Shumnalieva R, Tumangelova-Yuzeir K, Kachakova D, Ivanova-Todorova E, et al. (2018). 25-OH Vitamin D3/D2 levels in osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients. *Annals of Chronic Diseases*, 2(1) : 1004.
- Venkatesha SH, Dudics S, Astry B, Moudgil KD. (2016). Control of autoimmune inflammation by celastrol, a natural triterpenoid. *Pathogens and Disease*, 74, ftw059.
- Venkatesha S, Acharya B, Moudgil K. (2018). Natural products as source of anti-inflammatory drugs. In *Inflammation : From molecular and cellular mechanisms to the clinic* ; Cavaillo JM, Singer M. Eds. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA : Weinheim, Germany, 2018 ; Chapter 64 ; pp. 1607-1635.
- Verstrepen L, Beyaert R. (2014). Receptor proximal kinases in NF-kappa B signaling as potential therapeutic targets in cancer and inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 92, 19-29.
- Vinegar R, Schreiber W, Hugo R. (1969). Biphasic development of carrageenan oedema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 166, 96-103.
- Vladimir-Knežević S, Blažeković B, Bival Štefan M, Babac M. (2012). Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health. In *Phytochemicals as nutraceuticals- Global approaches to their role in nutrition and health*. Venketeshwer Rao, IntechOpen.
- Vongsak B, Sithisarn P, Mangmool S, Thongpraditchote S, Wongkrajang Y, et al. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, 44, 566-571.
- Wahba MG, Messiha BA and Abo-Saif AA. (2016). Protective effects of fenofibrate and resveratrol in an aggressive model of rheumatoid arthritis in rats. *Pharmaceutical Biology*, 54:1705-1715.

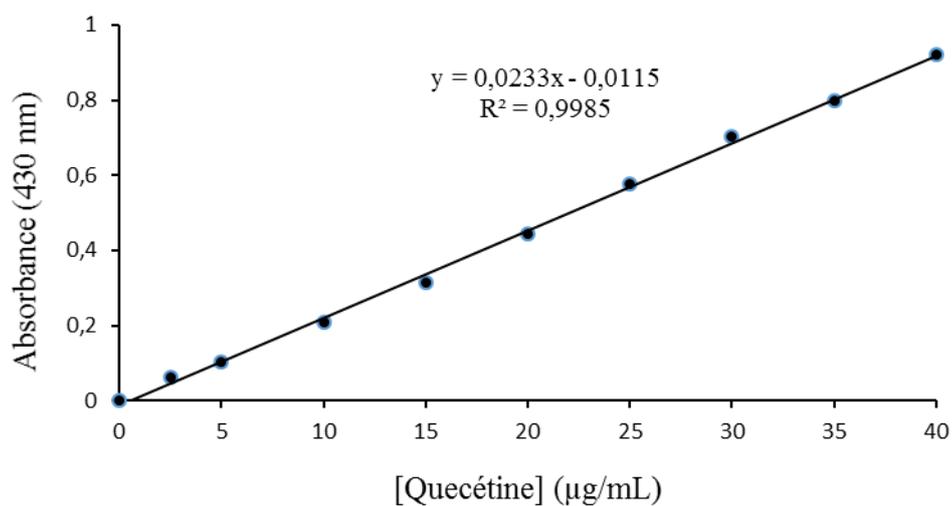
- Wang C, Schuller Levis GB, Leeetal EB. (2004). Platycodin D and D3 isolated from the root of *Platycodon grandiflorum* modulate the production of nitric oxide and secretion of TNF- α in activated RAW 264.7 cells. *International Immunopharmacology*, 4(8), 1039-1049.
- Wang Y, Shaked I, Stanford SM, Zhou W, Curtsinger JM, Mikulski Z, Shaheen ZR, et al. (2013). The autoimmunity-associated gene PTPN22 potentiates toll-like receptor-driven, type 1 interferon-dependent immunity. *Immunity*, 39(1), 111-22.
- Wang W, Jian Z, Guo J, Ning X. (2014). Increased levels of serum myeloperoxidase in patients with active rheumatoid arthritis. *Life Sciences*, 117, 19-23.
- Wang Y, Guo S, Shen Z, Wang Y, Yang L, Xu Q. (2014). Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 152, 540-545.
- Wang W, Sun W, Jin L. (2017). Caffeic acid alleviates inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by inhibiting phosphorylation of I κ B kinase α/β and I κ B α . *International Immunopharmacology*, 48, 61-66.
- Wen H, Baker JF. (2011). Vitamin D, immunoregulation, and rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Rheumatology*, 17, 102-7.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. (2004). Flavonoids : antioxidants or signaling molecules ? *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838-849.
- Wilsdon TD, Hill CL. (2017). Managing the drug treatment of rheumatoid arthritis. *Australian prescriber*, 40(2), 51-58.
- Wink M. (2012). Medicinal plants : source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules*, 17, 12771-12791.
- Wink M. (2015). Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines*, 2, 251-286.
- Winter CA, Risley E, Nuss G. (1962). Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111, 544-547.
- Wu X, He B, Liu J, Feng H, Ma Y, Li D, Guo B, Liang C, Dang L, Wang L, et al. (2016). Molecular insight into gut microbiota and rheumatoid arthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 431.
- Yadava N, Yadava R, Goyal A. (2014). Chemistry of Terpenoids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 27(2), 272-278.
- Yazaki K, Gen-ichiro Arimura GI, Toshiyuki Ohnishi T. (2017). 'Hidden' Terpenoids in Plants : Their biosynthesis, localization and ecological roles. *Plant and Cell Physiology*, 58(10), 1615-1621.
- Yeoh N, Burton JP, Suppiah P, Reid G, Stebbings S. (2013). The role of the microbiome in rheumatic diseases. *Current Rheumatology Reports*, 15, 314.
- Yoon HY, Lee EG, Lee H, Cho IJ, Choi YJ, Sung MS et al. (2013). Kaempferol inhibits IL-1 β -induced proliferation of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and the production of COX-2, PGE2 and MMPs. *International Journal of Molecular Medicine*, 32:971-977.
- Yordi EG, Pérez EM, Matos MJ, Villares EU. (2012). Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. *Nutrition, Well-Being and Health*, Jaouad Bouayed and Torsten Bohn, IntechOpen.

- Young AJ, Lowe GL. (2018). Carotenoids-antioxidant properties. *Antioxidants*, 7(2), 28.
- Zhang ZC, Zhang SJ, Jin B, Wu Y, Yang XF, Yu B, Xie QM. (2015). Ciclamilast ameliorates Adjuvant-Induced Arthritis in a rat model. *BioMed Research International*, Article ID 786104, 11 pages.
- Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, Dong W. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 4350965, 18 pages.
- Zheng CD, Li G, Li H-Q, Xu X-J, Gao J-M, Zhang A-L. (2010). DPPH-scavenging activities and structure-activity relationships of phenolic compounds. *Natural product communications*, 5 (11).
- Zheng Z, Sun Y, Liu Z, Zhang M, Li C, Cai H. (2015). The effect of curcumin and its nanoformulation on adjuvant-induced arthritis in rats. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 4931-4942.
- Zhou B, Wu LM, Yang L, Liu ZL. (2005). Evidence for alpha-tocopherol regeneration reaction of green tea polyphenols in SDS micelles. *Free Radical Biology and Medicine*, 38: 78-84.
- Zhou L, Wang J, Li J, Li T, Chen Y, June RR, Zheng SG. (2019). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Ameliorates Collagen-Induced Arthritis via suppression of Th17 cells through miR-124 mediated inhibition of IL-6 signaling. *Frontiers in immunology*, 10, 178.
- Ziegler J, Facchini PJ. (2008). Alkaloid biosynthesis : Metabolism and trafficking. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 735-769.

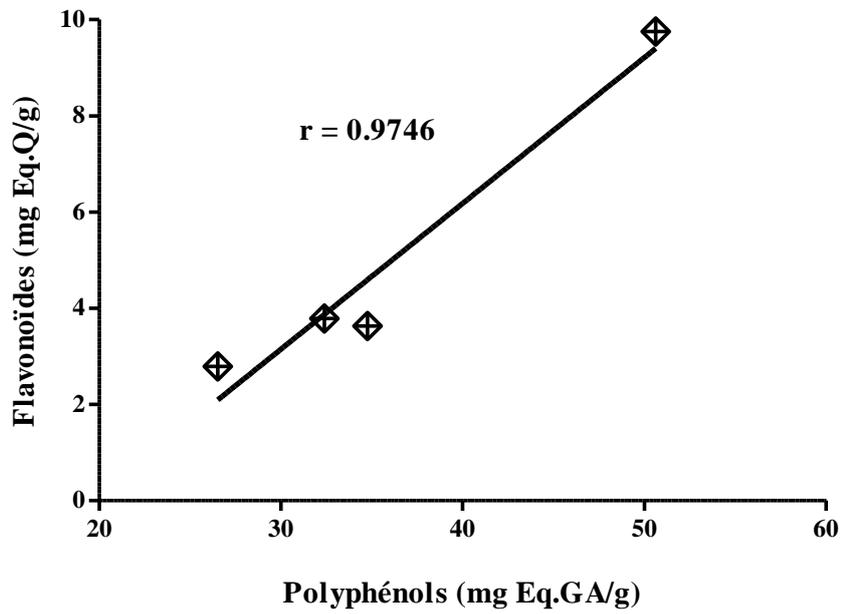
Annexes

Annexe 1

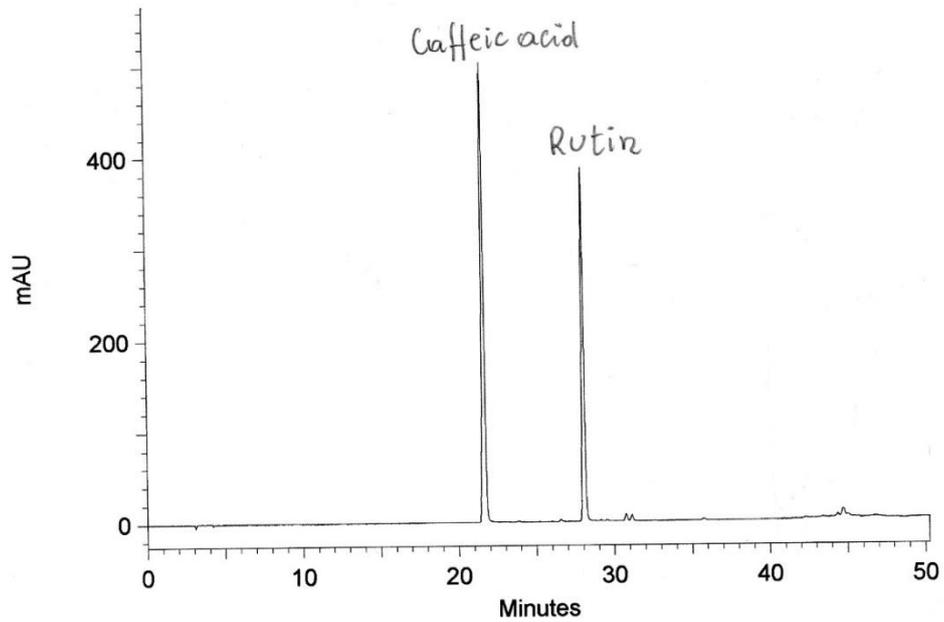
Droite standard à l'acide gallique pour le dosage des polyphénols



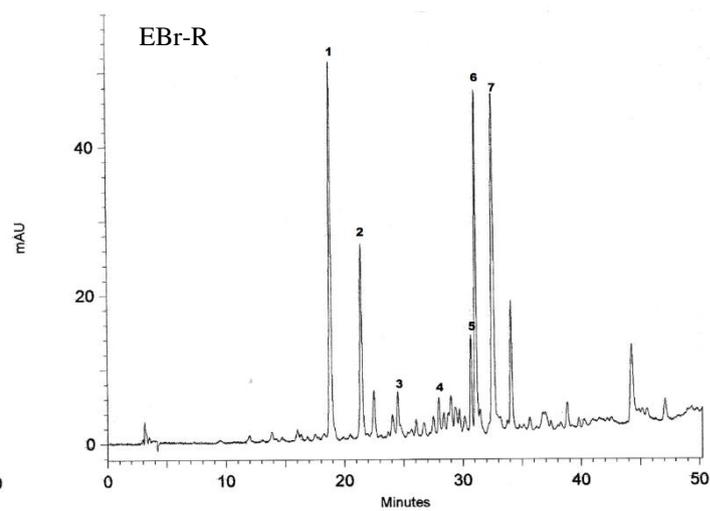
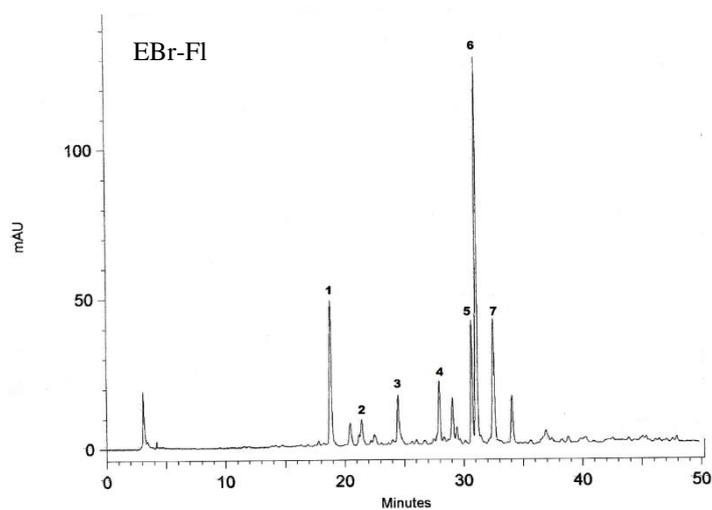
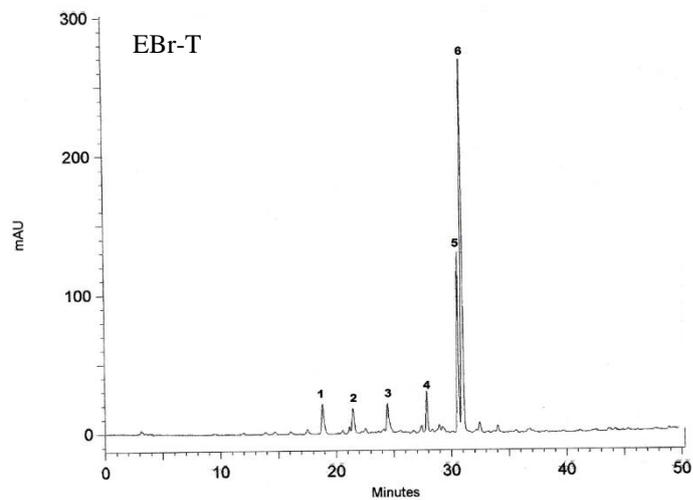
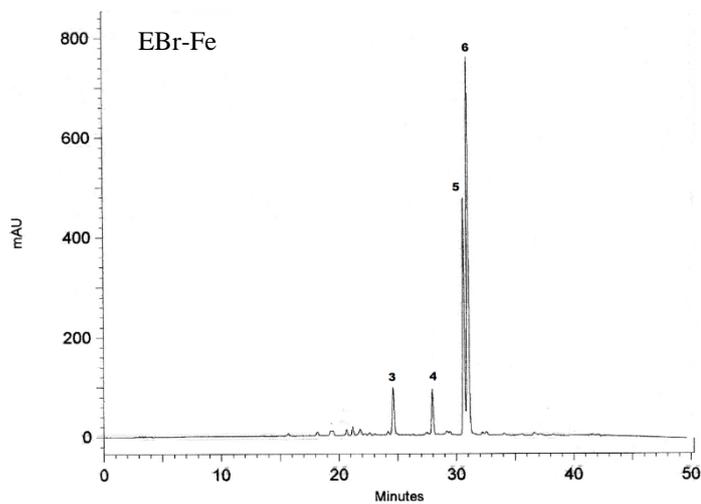
Droite standard à la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Annexe 2

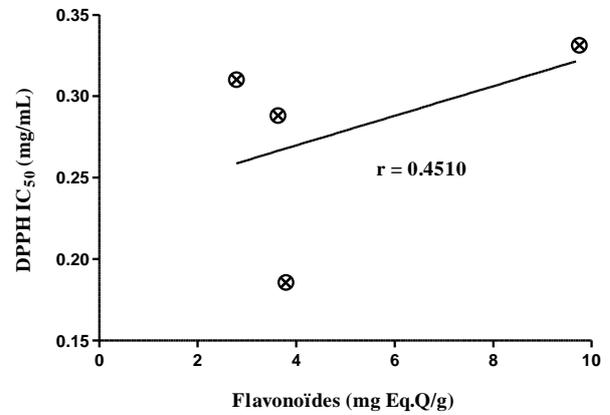
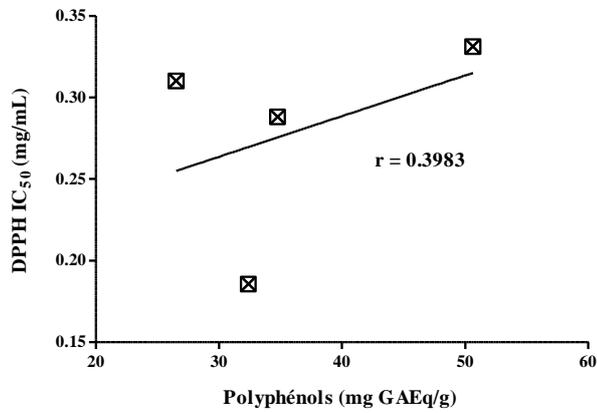
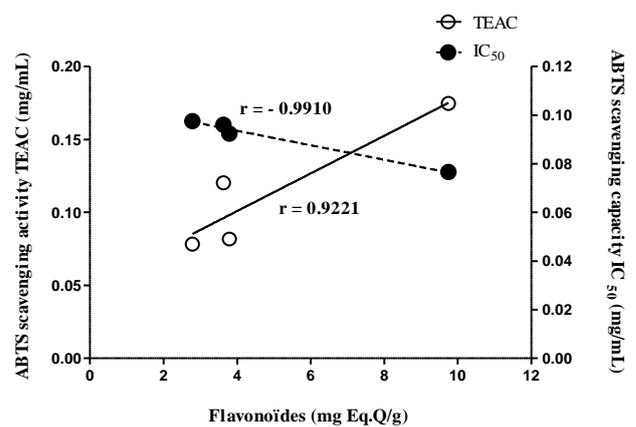
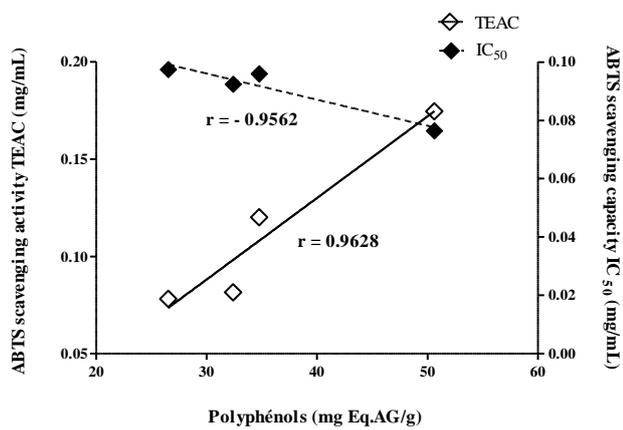
Corrélation entre le contenu en polyphénols et en flavonoïdes

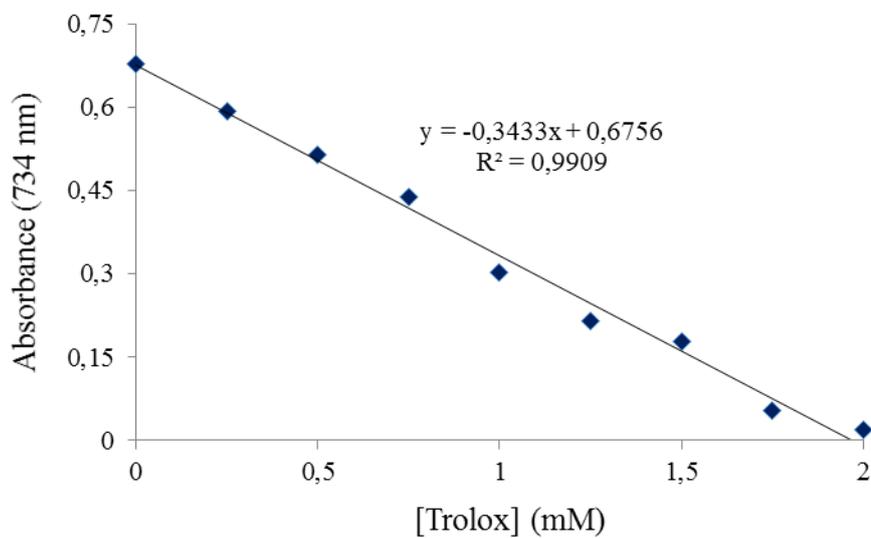


Spectre-UV de référence des standards acide caféique et rutine

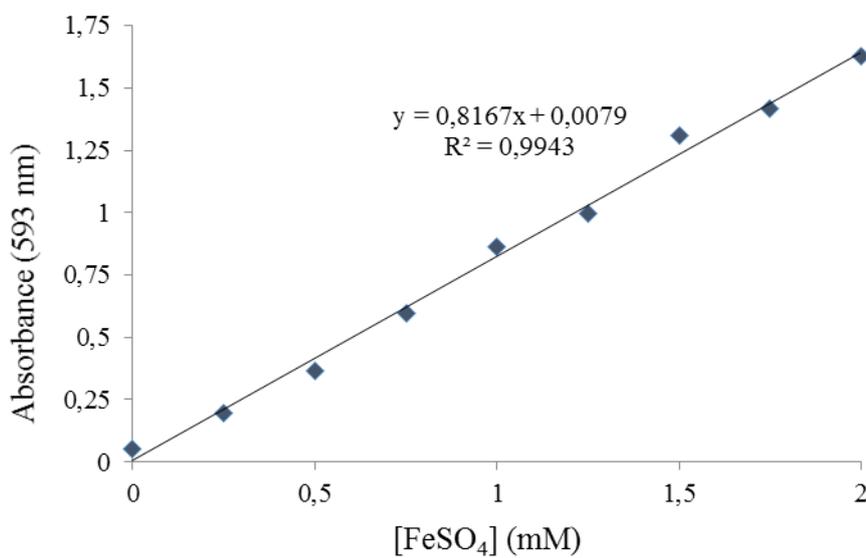
Annexe 3

Profil chromatographique de l'analyse des extraits bruts de HC par HPLC-DAD

Annexe 4Corrélation entre le contenu en polyphénols et en flavonoïdes et l'activité anti-DPPHCorrélation entre le contenu en polyphénols et en flavonoïdes et l'activité anti-ABTS

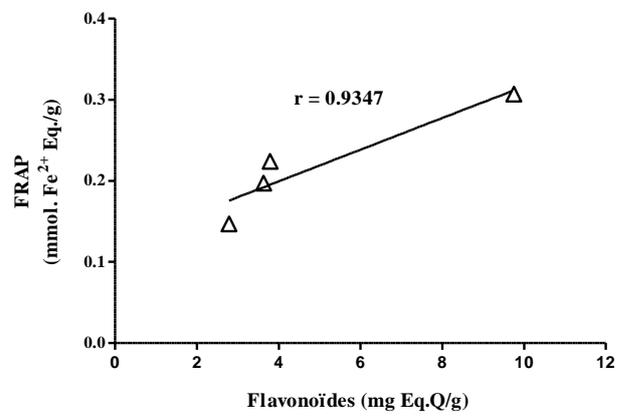
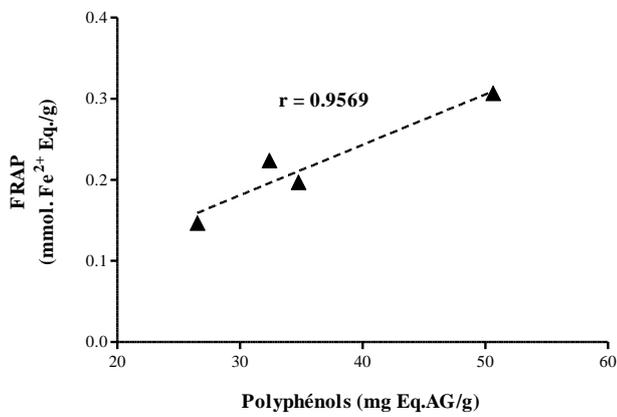
Annexe 5

Droite standard au trolox pour le test à l'ABTS⁺ (TEAC)

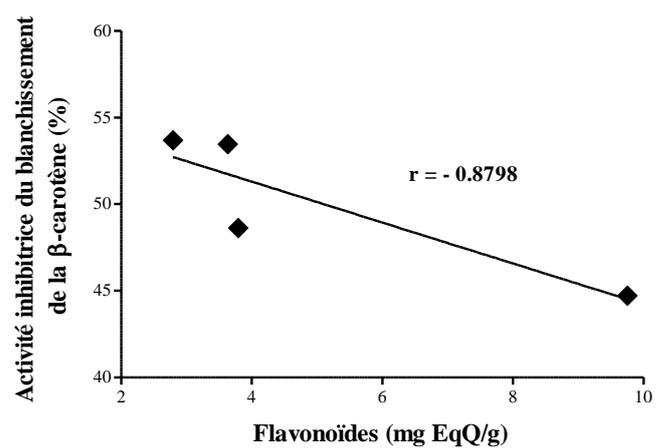
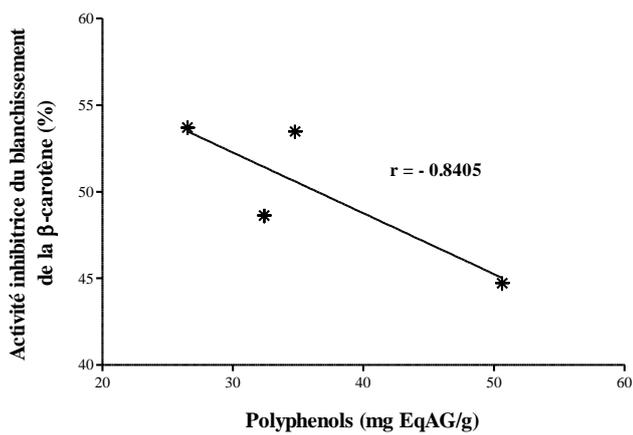


Droite standard au FeSO₄ pour le test du FRAP

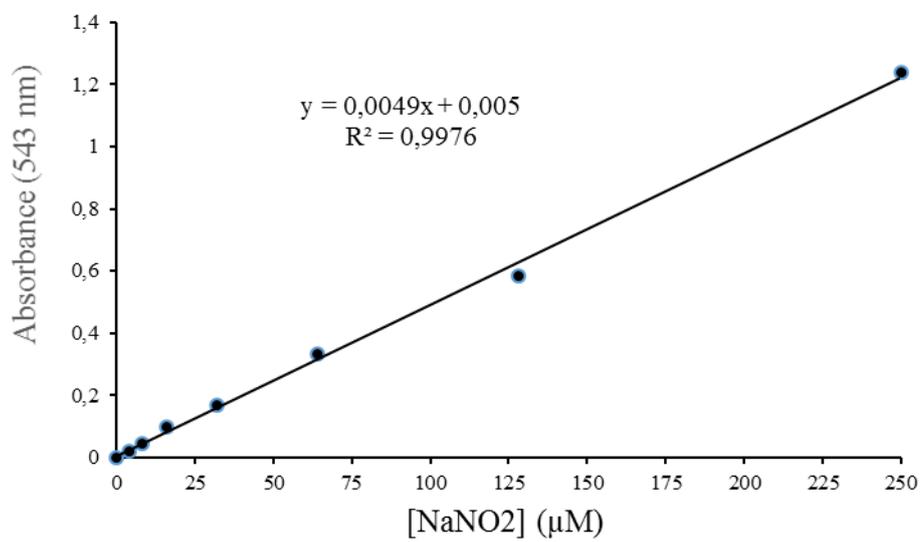
Annexe 6



Corrélation entre le contenu en polyphénols et en flavonoïdes et l'activité réductrice du fer



Corrélation entre le contenu en polyphénols et en flavonoïdes et l'activité inhibitrice du blanchissement de la β -carotène

Annexe 7

Droite standard au NaNO_2 pour le dosage du NO plasmatique

Comparative study of the polyphenol content related-antioxidant and anti-inflammatory activities of methanolic extracts from different parts of *Hertia cheirifolia*

KATIA ABDELOUHAB^{1,2}, SANA AOUACHRIA¹, THORAYA GUEMMEZ¹, NOUREDDINE CHAREF¹, ABDERRAHMANE BAGHIANI¹, HAYETTE LOUAÏLECHE², RYSZARD AMAROWICZ³, AND LEKHMICI ARRAR^{1*}.

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

²Laboratory of Applied Biochemistry, Department of Food Sciences. Faculty of Nature and Life Sciences. University Abderrahmane Mira, 06000, Bejaia, Algeria.

³Department of Chemical and Physical Properties of Food. Division of Food Sciences, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, 10-474 Olsztyn, Poland. Email id: lekhararr@hotmail.com, (m) : +213 666 466 220.

Received: 25.07.19, Revised: 25.08.19, Accepted: 25.09.19

ABSTRACT

Hertia cheirifolia is one of the endemic Mediterranean medicinal plants, belonging to the Asteraceae family. This plant is traditionally used for its therapeutic effects on digestive disorders and wound healing. In the present study, the total phenolic and flavonoid contents of methanolic extracts from leaves, stems, flowers and roots of *Hertia cheirifolia* were evaluated using the Folin-Ciocalteu reagent and AlCl₃ methods respectively. Their antioxidant activity was then assessed by measuring the capacity to scavenge the free radical ABTS^{•+}. The ferric reducing antioxidant power (FRAP) and the inhibition of β-carotene bleaching were also estimated for each extract. The anti-inflammatory activity was tested using the PMA-induced ear oedema model in mice. The leaf extract contained the highest amounts of polyphenols (50.61 ± 6.21 mg GAE/g) and flavonoids (9.75 ± 0.03 mg QE/g). The leaf extract also displayed the most potent antioxidant capacity against the ABTS^{•+} cation radical (IC₅₀ = 76.48 ± 0.58 µg/mL) and the highest ferric reducing power (307 ± 3 µmol. Fe²⁺ Eq/g). However, all extracts showed approximately 65% inhibitory activity against β-carotene bleaching. Finally, the stem and root extracts exerted the strongest (~ 50%) anti-inflammatory effect in mice with ear oedema. These results revealed that all *Hertia cheirifolia* parts are a valuable source of polyphenols with potent antioxidant and anti-inflammatory properties.

Key words: *Hertia cheirifolia*, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

INTRODUCTION polyphenols were previously reported to have anti-inflammatory effects by modulating the enzymatic long been used for as an alternative therapy [1,2]. inflammatory cascade [1, 12, 13]. It has been reported in previous studies that chloroform and Mediterranean medicinal plants belonging to the Asteraceae family. *Hertia* contains 12 species water extract of aerial parts of *H. cheirifolia* contain distributed throughout South and North Africa and different sesquiterpene components [4, 14, 15]. Southwest Asia [3]. The Algerian flora consists of only *Hertia cheirifolia*, which grows in vegetative parts and roots from eastern areas [4]. *H. cheirifolia* is a small aromatic rich source of essential oils [5, 16, 17] with several plant with yellow flowers known as a rich source of biological activities, namely, acaricidal, antidiabetic bioactive compounds and volatile oils [5]. *H. cheirifolia* and antibacterial effects [16, 18, 19]. Similarly, *cheirifolia* is generally used for its therapeutic methanolic extracts from the leaves of *H. cheirifolia* properties in digestive disorders and in healing skin have been evaluated for antioxidant, anti-wounds [6]. Phenolic compounds including flavonoids inflammatory, anti-spasmodic and antibacterial are the most important group of natural products [7]. activities [20-23]. In the present study, we studied The structures of a large number of phenolic methanolic extracts from the leaves, stems, flowers compounds were identified [7-9] and several and roots of *Hertia cheirifolia* in terms of polyphenol biological activities were attributed to their and flavonoid contents. The *in vitro* antioxidant and pharmacological and therapeutic properties [1, 9, *in vivo* anti-inflammatory activities were also 10]. Polyphenols are known for their antioxidant identified. The aim of this study was to compare the activity due to their hydroxyl groups that donate phenolic contents and their biological activities from hydrogen to free radicals [9, 11, 12]. In addition, different parts of *H. cheirifolia*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and preparation of extracts

The entire *Hertia cherifolia* plant was collected during flowering stage from Ras El Oued in Bordj Bouarrerdj region, Algeria. The plant was authenticated by Prof. Hocine Laouer at the Department of Vegetal Biology and Ecology, University of Setif 1. First, leaves, stems, flowers and roots from *H. cheirifolia* were separated and air-dried away from sun light. The dried parts were then ground into a fine powder and a methanol extract was prepared from each part by maceration. Briefly, the powder was extracted in absolute methanol (10%: w/v) three times for 7 days each time at room temperature. The methanol was then filtered and the obtained filtrates were evaporated in a rotary vacuum at 40°C. Finally, each extract was dried at 40°C then stored in an airtight container until use. The yield of extraction was estimated for each part of the plant.

Animals

Male Swiss albino mice (6 weeks old) weighing 22-25 g, purchased from "Institut Pasteur d'Algérie", were used in this study. The animals were acclimated to the new environment for one week before the experiment. They were provided normal conditions with a 12 h light/dark cycle and a free access to food and water. The mice were randomly divided into 6 groups including the negative and the positive control groups (n=6). The animals handling was in accordance to the Helsinki Declaration of 2008 and with regard to the alleviation of suffering.

Determination of total phenolic and flavonoids content

The total phenolic content of the obtained extracts (leaves, stems, flowers and roots) was evaluated using Folin-Ciocalteu reagent according to Aouachria *et al.* [24]. The results were expressed as mg of gallic acid equivalent/g of dry weight (mg GAE/g dw). The total flavonoid content of the different extracts was estimated by the AlCl₃ method according to Aouachria *et al.* [24]. The flavonoid content was expressed as mg of quercetin equivalent/g of dry extract (mg QE/g dw).

Antioxidant activity

ABTS^{•+} scavenging assay

This assay is based on ABTS^{•+} (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline- 6-sulfonic acid) radical cation discoloration according to the method of Re *et al.* [25]. The ABTS^{•+} scavenging capacity was expressed as a percentage using different concentrations of each extract.

Ferric reducing antioxidant potential assay

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay was performed according to a method described by Benzie and Strain [26]. The absorbance measured at 593 nm, was compared to a FeSO₄ (0-2 mM) standard curve and the FRAP values were expressed as mmols of Fe²⁺equivalents per g of extract.

Beta carotene bleaching assay

The β-carotene bleaching (BCB) assay was carried out according to the method used by Baghiani *et al.* [27]. Samples were incubated at 50°C for 2 h and the kinetics of oxidation of the β-carotene/linoleic acid emulsion was monitored every 15 min. Methanol and BHT were used as negative and positive controls respectively. The antioxidant activity was compared at 60 and 120 min, and was calculated as the percentage of inhibitory activity (IA%) using the following formula: $IA\% = A_0/A_t$; where A₀ is the initial absorbance.

Anti-inflammatory activity PMA-induced mouse ear oedema

According to Garrido *et al.* [28], ear oedema was induced by applying PMA to the right ear of each mouse and the left ear served as a control. One hour before PMA application, *H. cheirifolia* methanolic extracts in 4% DMSO were orally administered to the mice at 500 mg/kg. The four experimental groups PMA-L, PMA-S, PMA-F and PMA-R were treated with extracts of the leaves, stems, flowers and roots respectively. In addition, a positive control group was treated with Diclofenac[®] at 100 mg/kg (PMA-D) and the negative control group (Untreated) received only 4% DMSO in distilled water. Six hours after PMA application, mice were sacrificed by cervical dislocation and a 6 mm diameter disc was removed from each ear with a metal punch. The thickness of each disc was measured. The size of the oedema was calculated by subtracting the thickness of the left ear (only DMSO) from the thickness of the right one (PMA application). The percentage of inhibition was compared to the Diclofenac[®] group (PMA-D).

STATISTICAL ANALYSIS

The results were calculated as the mean ± standard deviation (SD). The statistical analysis was performed with GraphPad Prism.5 Software using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test. Dunnett's test was used to compare controls to test groups. Values of *p* < 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Total phenolic and flavonoid contents

As shown in Table 1, the evaluation of total phenolic and flavonoid content in methanolic extracts from the different parts of *H. cheirifolia* revealed that leaf extracts contained significantly higher amounts (*p* < 0.05) of polyphenols and flavonoids than other parts of the plant. In contrast, extracts from the flowers, roots and stems showed similar amounts of polyphenols. However, flavonoid amounts were significantly the lowest in the stem extracts (*p* < 0.05). Regarding the yield of extraction, the flowers seemed to generate the largest yield compared to the other parts of the *H. cheirifolia* plant.

Table 1. Extraction yields, total phenolic and flavonoid contents in methanolic extracts from the leaves, stems, flowers and roots of *Hertia cheirifolia*.

Values marked with a different letter along the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Extract	Extraction yield (%)	Total phenolic content (mg GAE/g dw)	Total flavonoids content (mg QE/g dw)
Leaves	16.33±0.63 ^a	50.61±6.21 ^a	9.75±0.03 ^a
Stems	13.82±0.90 ^a	26.52±0.29 ^b	2.79±0.18 ^b
Flowers	20.47±2.07 ^b	34.76±1.50 ^b	3.63±0.20 ^c
Roots	12.40±0.97 ^a	32.39±3.62 ^b	3.79±0.16 ^c

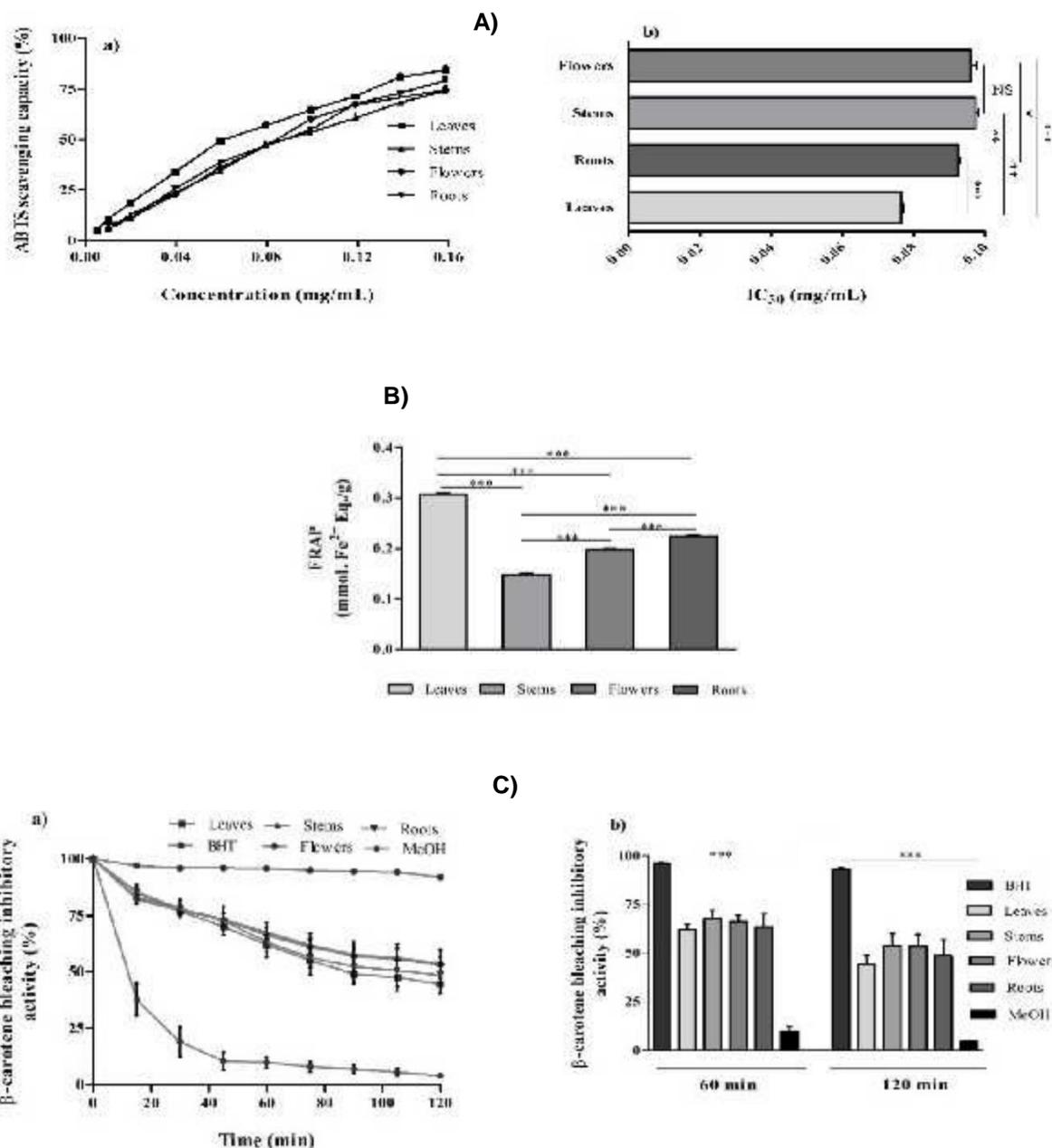


Figure 1. Antioxidant activity exerted by methanolic extracts from the leaves, stems, flowers and roots of *Hertia cheirifolia*. A) ABTS^{•+} radical cation scavenging effect. a) ABTS^{•+} scavenging capacity (%) versus concentration of the extracts. b) Concentration of extracts inhibiting 50% (IC₅₀) of the ABTS^{•+} oxidation. B) Ferric reducing antioxidant potential as mmol. of Fe²⁺ equivalents per gram of extract. C) Inhibition of β-carotene bleaching. a) Kinetics b) Rates of inhibition after 60 and 120 min (NS : non-significant, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

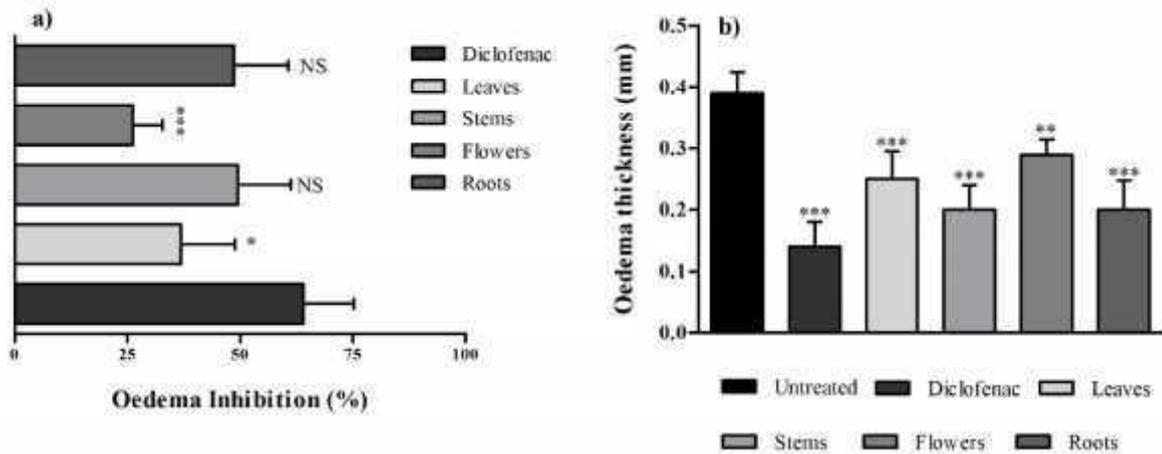


Figure 2. Anti-inflammatory activity of *Hertia cheirifolia* methanolic extracts in an ear oedema model. a) Percentage of ear oedema inhibition by the leaves, stems, flowers and roots compared to that of the Diclofenac® drug. b) Difference in oedema thickness between the different groups. Untreated, PMA-D : treated with Diclofenac®, PMA-L : treated with leaf extract, PMA-S : treated with stem extract, PMA-F : treated with flower extract, PMA-R : treated with root extract (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, * : $p < 0.001$).**

Polyphenols are heterogenic molecules produced during the secondary metabolism of plants. They consist of flavonoids and non-flavonoids [7, 8]. Evaluation of the total polyphenol and flavonoid contents demonstrated that extracts from all parts of *H. cheirifolia*, are a good source of these secondary metabolites. This evaluation is similar to previous studies showing that methanolic extract from *H. cheirifolia* leaves contained valuable levels of polyphenols [21, 23].

In vitro antioxidant activity

The antioxidant activities of the different extracts from *H. cheirifolia* were evaluated using three different antioxidant tests: the ABTS^{•+} free radical scavenging assay, the ferric reducing antioxidant power (FRAP) and the β-carotene bleaching assay (BCB). The ABTS^{•+} assay is one of the most commonly used methods in natural product antioxidant studies [29, 30]. The antioxidant activity of the *H. cheirifolia* extracts was determined by following the reduction of the ABTS^{•+} radical at 734 nm according to the disappearance of the green-blue colour [29]. All the tested extracts exhibited efficient ABTS^{•+} scavenging activity in a dose-dependent manner from 25% at 0.04 mg/mL to approximately 75% at 0.16 mg/mL (Figure 1A.a). Regarding the IC₅₀ values (Figure 1A.b), a lower IC₅₀ value indicates a higher scavenger effect. The leaf extract showed the most effective scavenging capacity against ABTS^{•+} followed by the root extracts (76.48 ± 0.58 vs 92.4 ± 3.98 µg/mL). These are significantly different ($p < 0.05$) from flowers and a stem extracts (97.48 ± 0.75 and 95.97 ± 1.73 µg/mL respectively). The IC₅₀ values towards the ABTS^{•+} free radical showed a high negative correlation with TPC and TFC in all extracts ($r^2 = - 0.9562$ and $r^2 = - 0.9909$ respectively). Assessing the free radical scavenging

capacity of herbal extracts is very important because of the damaging role of free radicals in biological systems. The ABTS^{•+} free radical is commonly reduced by antioxidants to its non-radical form and scavenged through electron donation [31]. The antioxidant effect is based on both hydrogen atom transfer (HAT) and single electron transfer (SET) [32]. Furthermore, it was shown that polyphenols are prominent antioxidants via their hydroxyl and other conjugated groups that inhibit the generation of free radicals and the deactivation of active precursors [33]. According to the FRAP assay, the leaf extracts displayed the highest reducing power followed by the root and then flowers extracts (307 ± 3; 224 ± 3 and 197 ± 3 µmol. Fe²⁺ Eq/g respectively). All extracts showed significantly different results ($p < 0.05$), (Figure 1C). The FRAP assay results showed a high positive correlation with the polyphenols and flavonoid content ($r^2 = 0.9568$ and $r^2 = 0.9347$ respectively). The FRAP assay was conducted under acidic conditions, where the Fe³⁺-TPTZ complex is reduced to the Fe²⁺ form by an antioxidant. A blue colour appears and the antioxidant effect is spectrophotometrically evaluated by monitoring the formation of the Fe²⁺-TPTZ complex [34]. Thus, polyphenols can also act as metal chelators, such as Fe²⁺, preventing oxidation caused by highly reactive hydroxyl radicals [35]. The ferric reducing antioxidant power of all *H. cheirifolia* extracts seems to be exerted by their phenolic compounds that may act as electron donors [35]. Finally, the inhibition of β-carotene bleaching by the different extracts of *H. cheirifolia* was assessed. The kinetics progress of the inhibitory activity during 120 min, and the rates of inhibition at 60 and 120 min values are illustrated in Figure 1C (a, b). All extracts displayed strong and similar inhibitory activities of approximately 65% after

60 min of incubation. At the end of incubation, the rate of inhibition of β -carotene bleaching was approximately 50% for all extracts without any significant difference ($p < 0.05$). In the β -carotene assay, oxidation of the linoleic acid present in the test tubes led to peroxy free radical ($LOO\cdot$) generation

[34]. These radicals oxidize the highly unsaturated β -carotene and consequently decrease the β -carotene amount present in the emulsion [36]. The β -carotene bleaching assay allows the investigation of the early steps of lipid peroxidation. The generation of free radicals causes lipid peroxidation to progress leading to the production of secondary oxidation products [36]. The presence of antioxidants in the test emulsion decreases the oxidation of β -carotene. The hydrogen peroxides are neutralized after a competitive reaction with the bioactive molecules contained in the extracts [37]. Therefore, the rate of inhibition of β -carotene bleaching depends on the antioxidant capacity of the studied extracts [32]. This assay confirms the antioxidant capacity of all methanolic extracts from *H. cheirifolia*. Similar results were found for the methanolic extract from the leaves of *H. cheirifolia* [21, 23].

In vivo anti-inflammatory activity

After an oral administration of 500 mg/kg of body weight from each extract, all extracts showed varied anti-inflammatory rates increasing as follows, flowers (26.26%), leaves (36.86%), roots (48.65%) and stems (49.49%), (Figure 2). Although *H. cheirifolia* extracts are not pure molecules, they mostly display between 40% and approximately 75% of the potential exerted by Diclofenac[®]. The stem and root extracts, displayed no significantly different anti-inflammatory potential from the Diclofenac[®] potential ($p < 0.05$).

The topical application of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) to mouse skin is a well-established model used to assess the *in vivo* anti-inflammatory effect of different molecules. Using this model, it clearly appears that *H. cheirifolia* methanolic extracts possess a potent anti-inflammatory effect. This potential is probably due to the polyphenols and flavonoids contained in these extracts. However, the variation of the anti-inflammatory activities may be due to the qualitatively and quantitatively different composition of each extract, in addition to the different gastro-intestinal metabolism and low bioavailability of these bio-active elements [38, 39]. PMA is known as a protein kinase C (PKC) promoter, that is able to induce the formation of free radicals *in vivo* [39]. However, phenolic compounds are thought to act either by scavenging reactive oxygen species (ROS) or by enhancing antioxidant pathways. Polyphenols may also act as anti-inflammatory agents by scavenging free radicals or by inhibiting the activities of enzymes implicated in the pro-inflammatory immune response, such as cyclooxygenase 2 (COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) [12]. In addition, it was previously

reported that polyphenols and flavonoids may act *in vivo* as modulators of kinase signalling pathways in addition to their action as co-antioxidants by regeneration of essential vitamins [40, 41]. Indeed, a high intake of phenolics is likely related to a decreased rate of development of inflammatory chronic diseases [11, 41].

CONCLUSION

Taken together, our results revealed that the leaves, stems, flowers and roots of *H. cheirifolia* make a valuable source of bioactive molecules with great antioxidant and anti-inflammatory properties. However, among the different parts of *H. cheirifolia*, the results showed that leaves are the most important part in terms of polyphenol and flavonoid contents and their biological activities. Interestingly, and for the first time, our study showed that the stems, flowers and roots of *H. cheirifolia* are not much less effective than the leaf extracts even in terms of antioxidant and anti-inflammatory activities or polyphenol content. Finally, to better understand the mechanism of action of these extracts as antioxidants and anti-inflammatory agents, it is necessary to analyse the different active natural entities in each extract to understand the structure-activity relationship.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the General Management of the Scientific Research and the Technological Development (DGRSDT).

REFERENCES

1. Ambriz-Pérez, D.L., Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E.P., Heredia, J.B. (2016). Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food Agric*, 2, 1-14.
2. Cheng, Y.T., Yang, C.C., Shyr, L.F. (2016). Phytomedicine-modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. *Pharmacol Res*, 114, 128-143.
3. Akhgar, M.R., Ghazanfari, D., Shariatifar, M. (2013). Chemical composition of the essential oil of *Hertia intermedia* (Boiss.) O. Kuntze from Iran. *JEOBP*, 15, 360-363.
4. Massiot, G., Nuzilliard, J.M., Le Men-Olivier, L., Aclinou, P., Benkouider, A., Khelifa, A. (1990). Eremophilenolides from *Hertia cheirifolia*. *Phytochemistry*, 29, 2207-2210.
5. Zellagui, A., Gherraf, N., Lahouel, M. (2012). Drimenin-rich essential oils from *Hertia cheirifolia* growing in Algeria. *J New Technol Mater*, 2, 38-40.
6. Chermat, S., Gharzouli, R. (2015). Ethnobotanical Study of Medicinal Flora in the North East of Algeria - An Empirical Knowledge in Djebel Zdim (Setif). *J Mater Sci Eng*, 5, 50-59.
7. Corcoran, M.P., McKay, D.L., Blumberg, J.B. (2012). *Flavonoid Basics: Chemistry, sources, mechanisms of*

- action, and safety. *Nutr Gerontol Geriatr*, 31, 176-89.
8. Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. (2016). Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci*, 5, 1-15.
 9. Kumar, S., Pandey, A.K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci World J*, 162750.
 10. Chiva-Blanch, G., Visioli, F. (2012). Polyphenols and health: Moving beyond antioxidants. *J Berry Res*, 2, 63-71.
 11. Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M.C.B., Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us? *Oxid Med Cell Longevity*, 4, 1-9.
 12. George, V.C., Vijesh, V.V., Amaratathn, D.I.M., Lakshmi, C.A., Anbarasu, K., Kumar, D.R.N., Ethiraj, K.R., Kumar, R.A., Rupasinghe, H.P.V. (2016). Mechanisms of action of flavonoids in prevention of inflammation associated skin cancer. *Curr Med Chem*, 23, 1-20.
 13. Aggarwal, B.B., Prasad, S., Reuter, S., Kannappan, R., Yadev, V.R., Park, B., Kim, J.H., Gupta, S.C., Phromnoi, K., Sundaram, C., Prasad, S., Chaturvedi, M.M., Sung, B. (2011). Identification of novel anti-inflammatory agents from ayurvedic medicine for prevention of chronic diseases: "reverse pharmacology" and "bedside to bench" approach. *Curr Drug Targets*, 12, 1595-1653.
 14. Aclinou, P., Benkouider, A., Massiot, G., Le Men-Olivier, L. (1991). Eremophilanolides from *Hertia cheirifolia*. *Phytochemistry*, 30, 2083-2084.
 15. Aclinou, P., Massiot, G. (1993). Absolute configuration of eremophilanolide from *Hertia cheirifolia*. *Phytochemistry*, 34, 859-860.
 16. Majouli, K., Hlila, M.B., Hamdi, A., Flamini, G., Ben Jannet, H., Kenani, A. (2016). Antioxidant activity and α -glucosidase inhibition by essential oils from *Hertia cheirifolia* (L.). *Ind Crops Prod*, 82, 23-28.
 17. Segueni, N., Zellagui, A., Boulechfar, S., Derouiche, K., Rhouati, S. (2017). Essential oil of *Hertia cheirifolia* leaves: chemical composition, antibacterial and antioxidant activities. *J Mater Environ Sci*, 8, 551-556.
 18. Attia, S., Grissa, K.L., Mailleux, A.C., Heuskin, S., Lognay, G., Hance, T. (2012). Acaricidal activities of *Santolina africana* and *Hertia cheirifolia* essential oils against the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). *Pest Manag Sci*, 68, 1069-76.
 19. Majouli, K., Hlila, H.B., Flamini, G., Ben Jannet, H., Kenani, A. (2016). In vitro antibacterial activity of the *Hertia cheirifolia* L. essential oils. *J Coast Life Med*, 4, 865-867.
 20. Ammar, S., Edziri, H., Mahjoub, M.A., Chatter, R., Bouraoui, A., Mighri, Z. (2009). Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from *Hertia cheirifolia*. *Phytomedicine*, 16, 1156-61.
 21. Bousselesla, H., Benhouda, A., Yahia, M., Benbia, S., Ghecham, A., Zidani, A. (2012). In vitro evaluation of antioxidant and antibacterial activities of extracts of *Hertia cheirifolia*'s leaves. *Nat Sci*, 4, 825-831.
 22. Bouriche, H., Kada, S., Assaf, A.M., Senator, A., Gül, F., Dimertas, I. (2016). Phytochemical screening and anti-inflammatory properties of Algerian *Hertia cheirifolia* methanol extract. *Pharm Biol*, 54, 2584-2590.
 23. Kada, S., Bouriche, H., Senator, A., Demirtas, I., Özen, T., Toptanci, B.C., Kızıld, G., Kızıld, M. (2016). Protective activity of *Hertia cheirifolia* extracts against DNA damage, lipid peroxidation and protein oxidation. *Pharm Biol*, 55, 330-337.
 24. Aouachria, S., Boumerfeg, S., Benslama, A., Benbacha, F., Guemmez, T., Khennouf, S., Arrar, L., Baghiani, A. (2017). Acute, sub-acute toxicity and antioxidant activities (in vitro and in vivo) of *Reichardia picroide* crude extract. *J Ethnopharmacol*, 208, 105-116.
 25. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med*, 26, 1231-1237.
 26. Benzie, I.F., Strain, J.J. (1999). Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*, 299, 15-27.
 27. Baghiani, A., Ameni, Dj., Boumerfeg, S., Adjadj, M., Djarmouni, M., Charef, N., Khennouf, S., Arrar, L. (2012). Studies of antioxidants and xanthine oxidase inhibitory potentials of root and aerial parts of medicinal plant *Capparis spinosa* L. *Am J Med Med Sci*, 2, 25-32.
 28. Garrido, G., González, D., Lemus, Y., Garcia, D., Lodeiro, L., Quintero, G., Delporte, C., Núñez-Sellés, A.J., Delgado, R. (2004). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®). *Pharmacol Res*, 50, 143-149.
 29. Moon, J.K., Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. *J. Agric. Food Chem*, 57, 1655-1666.
 30. Bendary, E., Francis, R.R., Sarwat, M.I., El Hady, S. (2013). Antioxidant and structure-activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds. *Ann Agric Sci*, 58, 173-181.
 31. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem*, 53, 4290-4302.
 32. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20, 933-956.
 33. Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants *J Nat Prod*, 63, 1035-1042.
 34. Huang, D., Boxin, O., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*, 53, 1841-1856.
 35. Perron, N.R., Brumaghim, J.L. (2009). A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*, 53, 75-100.
 36. Tsuchihashi, H., Kigoshi, M., Iwatsuki, M., Niki, E. (1995). Action of β -carotene as an antioxidant

- against lipid peroxidation. Arch Biochem Biophys, 323, 137-147.
37. Chaillou, L.L., Nazareno, M.A. (2006). New method to determine antioxidant activity of polyphenols. J Agric Food Chem. J Agric Food Chem, 54, 8397-8402.
 38. Monach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr, 79, 727-47.
 39. Eddouks, M., Chattopadhyay, D., Zeggwagh, N.A. (2012). Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. Evid Based Complement Alternat Med, 14.
 40. Upadhyay, S., Dixir, M. (2015). Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. Oxid Med Cell Longev, 1-15.
 41. Williams, R.J., Spencer, J.P., Rice-Evans, C.A. (2004). Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? Free Radic Biol Med, 36, 838-49.

ملخص

تعد نبتة *Hertia cheirifolia* L. من النباتات الطبية التي تنتمي الى عائلة Asteraceae وهي معروفة باستعمالها التقليدي في علاج اضطرابات الجهاز الهضمي والتام الجروح. تم من خلال هذه الدراسة العمل على مستخلصات ميثانولية لمختلف أجزاء النبتة (الورقة، الساق، الزهرة والجذر)، حيث أظهرت نتائج تحليل محتوى المركبات الفينولية أن مستخلص الأوراق (ED-Fe) يحتوي على اعلى كمية (50.61 ± 6.21 ميكروغ مكافئ غرامى حمض الغاليك /مغ من المستخلص). تم فيما بعد الكشف عن سبع مركبات فينولية مختلفة بواسطة تقنية التحليل الكروماتوغرافي (HPLC-DAD) و التي أظهرت وجود أربعة أحماض فينولية مشتقة من حمض الكافيك وثلاث مركبات الفلافونويد بما في ذلك روتين واثنان من مشتقاته. إضافة إلى ذلك، أظهر مستخلص الاوراق (ED-Fe) أعلى قدرة مضادة للأكسدة (76.48 ± 0.58 ميكروغرام / مل) ضد الجذر $ABTS^{++}$ وأقوى قدرة ارجاعية للحديد (0.307 ± 0.003 مل مول / غ من المستخلص). وقد أظهرت دراسة النشاط المضاد للالتهاب باستخدام النموذج التجريبي لوذمة الأذن ، المستحثة بزيت الكروتون عند الفأر، أن مستخلص (ED-Fe) كان له اقوى تأثيرمضاد للالتهاب (43.52 ± 6.08 %). بنفس الطريقة، أظهرالمستخلص (ED-Fe) فعاليته ضد الالتهاب في النموذج التجريبي لوذمة الساق ، المستحثة بمادة الكراجينين عند الجرذ ، والتي قدرت بنسبة (23.67 ± 1.55 %). وأخيرا، أظهرت دراستنا للدور الوقائي لمستخلصات *Hertia cheirifolia* من التهاب المفاصل تأثيرا معتبرا، خاصة بالنسبة لمستخلص (ED-Fe) الذي خفض من التهاب الساق المزمع المستحث بمعامل فروند الكامل عند الجرذ، و ذلك بنسبة (26.14 ± 4.4 %). و لقد كان هذا التأثير مصحوبا بتحسن ملحوظ في مختلف النتائج السريرية، المصلية و النسيجي . يشير مجمل هذه النتائج إلى أن الفاعلية المضادة للأكسدة و للالتهاب التي تميز مستخلصات نبتة *Hertia cheirifolia* ، لديها علاقة وثيقة بمحتواها من عديدات الفينول وهي تعد بذلك مصدرا طبيعيا هاما لتطوير جزيئات دوائية جديدة.

Résumé

Hertia cheirifolia L. est une plante médicinale de la famille des Asteraceae connue pour son usage traditionnel dans le traitement des troubles digestifs et la cicatrisation des plaies. La présente étude a porté sur des extraits méthanoliques des différentes parties de la plante (feuille, tige, fleur et racine). D'abord, l'analyse du contenu en composés phénoliques a montré que la teneur la plus élevée est contenue dans l'extrait de feuille (ED-Fe) (50.61 ± 6.21 mg EAG/g d'extrait). Sept différents composés phénoliques ont été identifiés par HPLC-DAD, dont quatre acides phénoliques dérivés de l'acide caféique et trois flavonoïdes dont la rutine et deux de ses dérivés. Par ailleurs, L'extrait ED-Fe a montré la capacité antioxydante la plus élevée envers le radical $ABTS^{++}$ (76.48 ± 0.58 $\mu\text{g/mL}$), et le meilleur pouvoir réducteur du fer (0.307 ± 0.003 mmol. Fe^{2+}/g d'extrait). L'étude de l'activité anti-inflammatoire dans le modèle de l'œdème de l'oreille induit à l'huile de croton chez la souris a montré que l'extrait ED-Fe avait le meilleur effet ($43.52 \pm 6.08\%$). De même, le modèle de l'œdème de la patte induit à la carragénine chez le rat a été marqué par un effet significatif de l'extrait ED-Fe ($23.67 \pm 1.55\%$ à 200 mg/Kg). Enfin, un effet anti-inflammatoire préventif très intéressant a été obtenu, notamment avec l'extrait ED-Fe ($26.14 \pm 4.24\%$) dans le modèle d'arthrite induite à l'adjuvant complet de Freund (AIA) chez le rat. Cet effet a été accompagné d'une nette amélioration des paramètres cliniques, sériques et histologiques. L'ensemble de ces résultats, suggèrent que le potentiel antioxydant et anti-inflammatoire des extraits de *Hertia cheirifolia* serait fortement lié à leur contenu en polyphénols. Ceci constitue une source naturelle prometteuse pour le développement de nouvelles molécules pharmacologiques.

Abstract

Hertia cheirifolia L. is a medicinal plant that belongs to the Asteraceae family. This plant is known for its traditional use in the treatment of digestive disorders and wound healing in the east of Algeria and in Tunisia. In the present study, methanolic extracts from the different parts of the plant; leaf, stem, flower and root were used. First, phenolic compounds content analysis revealed that the highest content was obtained with the delipidated leaf extract (DE-L) (50.61 ± 6.21 mg EAG/g extract). Seven different phenolic compounds were identified by HPLC-DAD analysis, four of them were derived from caffeic acid in addition to three flavonoids including rutin and its derivatives. Furthermore, DE-L showed the highest antioxidant capacity towards the $ABTS^{++}$ radical (76.48 ± 0.58 $\mu\text{g/mL}$), and iron reducing capacity (0.307 ± 0.003 mmol. Fe^{2+}/g extract). The anti-inflammatory activity was studied using the croton oil-induced ear edema model in mice and showed that the DE-L had the strongest effect ($43.52 \pm 6.08\%$). Similarly, the carrageenan-induced paw edema model in rats was marked by a significant effect of DE-L ($23.67 \pm 1.55\%$ at 200 mg/Kg). Finally, a very interesting preventive anti-inflammatory effect was observed with DE-L ($26.14 \pm 4.24\%$) in the Freund's complete adjuvant induced arthritis (AIA) model in rats. This effect was associated with a considerable improvement in clinical, serological and histological parameters. These results suggest that the antioxidant and anti-inflammatory potential of *Hertia cheirifolia* extracts were strongly related to their polyphenols content. Our results support the use of this plant in traditional medicine and provide a promising natural source for the development of new pharmacological molecules.