

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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



جامعة فرحات عباس، سطيف 1  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2023

## THÈSE

Présentée par

**LAOUICHA Saliha**

Pour l'obtention du diplôme de

**DOCTORAT EN SCIENCES**

**Filière: BIOLOGIE**

**Spécialité: BIOCHIMIE**

THÈME

**Effets antioxydants et anti-inflammatoires d'extraits  
d'*Arbutus unedo* L.**

Soutenue publiquement le **08/07/2023**

DEVANT LE JURY

Président	<b>Bouriche Hamama</b>	<b>Pr. UFA Sétif 1</b>
Directeur	<b>Senator Abderrahmane</b>	<b>Pr. Univ Batna 2</b>
Examineurs	<b>Aoun Omar</b>	<b>Pr. Univ M'sila</b>
	<b>Guemmaz Thoraya</b>	<b>Dr. UFA Sétif 1</b>
	<b>Kadri Nabil</b>	<b>Pr. Univ Bouira</b>

*Laboratoire de Biochimie Appliquée*

## *Dédicace*

*En guise de reconnaissance envers mon **DIEU** le **Tout Puissant***

*Je dédie ce modeste travail à la communauté scientifique*

*Espérant qu'il lui sera utile.*

*A mes très chers parents*

*A mon mari et mon petit prince, ma source de joie, Amir.*

*À toute la famille Laouicha.*

*A toute ma belle-famille Bensalem.*

## **Remerciements**

*Avant tout, je remercie **Dieu**, le tout puissant, de m'avoir donné la volonté, la force et la patience pour pouvoir réaliser ce modeste travail de recherche.*

*J'exprime ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à mon directeur de thèse **Pr. SENATOR Abderrahmane**, qui m'a fait l'honneur de me proposer ce sujet et de m'a faire accepter de rapporter ce travail. Sa disponibilité, ses précieux conseils, sa compétence et sa compréhension m'ont permis de mener à terme ce travail.*

*Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail :*

*Madame **Pr. BOURICHE Hamama**, de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.  
Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

*Monsieur **Pr. AOUN Omar**, monsieur **Pr. KADRI Nabil** et madame **Dr. GUEMMAZ Thoraya** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Soyez assuré de ma profonde gratitude.*

*Je voudrais également adresser mes remerciements et ma gratitude au Professeur **LAOUAR Hocine** pour sa classification scientifique de la plante et au professeur **Raed M. Al Zoubi** pour l'analyse d'extraits par HPLC au niveau de son laboratoire en Jordanie.*

*J'aimerais également remercier vivement les membres de l'équipe laborantine, en particulier **KADA Seoussen** et **KHERBECHE Abdellah** qui ont partagé avec moi la vie quotidienne au sein du laboratoire.*

## ملخص

تهدف هذه الدراسة الى تقدير النشاطية المضادة للأكسدة والمضادة للالتهاب لمستخلص الأسيئات الإيثيل (E.AE) ومستخلص البوتانول (E.But) لأوراق نبتة *Arbutus unedo*. أظهر التحليل الكمي للمركبات الفينولية أن E.AE يحتوي على أعلى كمية من عديدات الفينول والفلافونويدات. أظهرت المستخلصات فعالية في حماية كريات الدم الحمراء من الانحلال، وقوة ارجاع لا باس بها في اختبار قدرة الارجاع واختبار الفوسفومولبيدات (PPM) مع تأثير احسن لـ E.AE مقارنة بـ E.But. كما أبدى هذا المستخلص الفعالية الاكبر في ازاحة جذور DPPH، ABTS، جذر الهيدروكسيل، أنيون فوق الأكسيد و جذر فوق اكسيد الهيدروجين بقيم  $IC_{50}$  3.43 ميكروغرام/مل، 1.59 ميكروغرام/مل، 323.45 ميكروغرام/مل، 103.80 ميكروغرام/مل و 11.56 ميكروغرام/مل على التوالي. ثبت كل من المستخلصين اكسدة  $\beta$ -carotene بنسب 92% و 85%، وأكسدة حمض اللينولويك بنسب 89% و 70% لـ E.AE و E.But على التوالي. من جهة أخرى، تم اختبار الفعالية المضادة للأكسدة في الحي، حيث تم تقييم نشاطية إنزيم Catalase و SOD ومستويات MDA و GSH في أنسجة كبد الفئران. أظهرت النتائج محافظة المستخلصين على نشاطية إنزيم Catalase وزيادة معنوية في نشاطية SOD. تسبب كلا المستخلصين في انخفاض معتبر في مستوى GSH مقارنة بالمجموعة الشاهدة والمجموعة المعالجة بحمض الاسكوربيك، في حين لم يتأثر مستوى MDA مع أي من المستخلصين. أدى التطبيق الموضعي لكلا المستخلصين بتركيز 2 مغ/أذن، في نموذج وذمة الأذن المحفز بزيت الكروتون إلى تقليل الالتهاب بنسبة 74% و 66%. كما بينت النتائج أن كلا المستخلصين وبتركيز 1 مغ/مل يثبطان هجرة الخلايا البيضاء ب 85.45% و 80.49% على التوالي. أظهرت أيضا المعالجة بالمستخلصين إلى تثبيط إتلاف بروتين الألبومين، كما ثبتت تحلل الكريات الدموية الحمراء بنسب 96% و 97% لكل من E.EA و E.But على التوالي، مقابل 98% لـ diclofenac. أظهرت هذه النتائج أن مستخلصي *Arbutus unedo* المستعملان في هذه الدراسة يملكان خصائص مضادة للأكسدة وللتهاب تعود إلى محتواهما من المركبات النشطة حيويًا، كالفلافونويدات وعديدات الفينول. على هذا، يمكن اعتبار هذه النبتة كمصدر غني بالمركبات النشطة حيويًا والتي تتميز بنشاطية مضادة للأكسدة و للالتهاب

**الكلمات الدالة:** مضاد الإلتهاب، مضاد الأكسدة، *Arbutus unedo*، الفلافونويدات، عديدات الفينول.

## Résumé

Le but de la présente étude est l'évaluation des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et l'extrait butanolique (E.But) des feuilles d'*Arbutus unedo*. Les extraits ont présenté une activité antihémolytique, un bon pouvoir réducteur dans les tests du pouvoir réducteur et le test phosphomolybdate (PPM) avec un meilleur effet de l'E.AE par rapport à l'E.But. De même, l'E.AE a montré le plus important effet piègeur vis-à-vis du radical DPPH, ABTS<sup>•+</sup>, du radical hydroxyle, d'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène avec des IC<sub>50</sub> de 3.43 µg/ml, 1.59 µg/ml, 323.45 µg/ml, 103.80 µg/ml et 11.56 µg/ml, respectivement. En plus, les deux extraits ont considérablement inhibé l'oxydation du β-carotène avec des taux de 92% et 85% et l'oxydation de l'acide linoléique avec des pourcentages de 89% et 70% pour l'E.AE et E.But respectivement. *In vivo*, l'activité de la catalase et de la SOD, et les taux du MDA et du GSH ont été évalués dans l'homogénat du foie de souris. Les résultats montrent une préservation de l'activité de la catalase et une augmentation significative de l'activité de la SOD. Les deux extraits ont induit une diminution significative du taux de GSH en comparaison avec le groupe contrôle et le groupe traité avec l'acide ascorbique. Par contre, le taux du MDA n'a pas changé. L'activité anti-inflammatoire des deux extraits a été également évaluée *in vivo* et *in vitro*. Le traitement local des souris par 2 mg/oreille d'E.AE ou d'E.But a inhibé significativement l'inflammation induite par l'huile de croton avec 74% et 66%, respectivement. De même, les deux extraits à la dose de 1 mg/poche ont significativement inhibé la migration des leucocytes (85.45% et 80.49%). D'autre part, le prétraitement par les deux extraits inhibe la dénaturation de la BSA et protègent les hématies contre l'hémolyse avec 96% et 97% pour l'E.AE et l'E.But respectivement contre 98% exercé par le diclofénac. Ces résultats montrent que les deux extraits d'*Arbutus unedo* ont des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires dues à la présence de composés bioactifs. En effet, l'analyse phytochimique a révélé que ces extraits sont riches en polyphénols et en flavonoïdes. Ainsi, la plante *Arbutus unedo* pourrait être exploitée comme source potentielle de composés bioactifs naturels doués d'activités anti-inflammatoire et antioxydante.

**Mots clés :** Anti inflammatoire, Antioxydant, *Arbutus unedo*, Flavonoïdes, Polyphénols.

## Abstract

In this study the antioxidant and the anti-inflammatory activities of ethyl acetate (E.AE) and butanol (E.But) extracts from leaves of *Arbutus unedo* were evaluated. Both extracts showed a significant protective effect against AAPH-induced erythrocyte hemolysis, with a good correlation between concentration and half-hemolysis time (HT<sub>50</sub>). The two extracts showed a good reducing activity in reducing power and phosphomolybdate (PPM) tests with remarkable effect of E.AE compared to E.But. E.AE also showed the most important scavenging effect against DPPH radical, ABTS radical, hydroxyl radical, superoxide anion and hydrogen peroxide with IC<sub>50</sub> values of 3.43 µg/ml, 1.59 µg/ml, 323.45 µg/ml, 103.80 µg/ml and 11.56 µg/ml respectively. In addition, the extracts inhibited the oxidation of β-carotene with percentages of 92% and 85% and the oxidation of linoleic acid with percentages of 89% and 70% for E.AE and E.But respectively. *In vivo*, catalase and SOD activities, MDA and GSH levels were evaluated in the homogenate of mouse liver. The results show a preservation of catalase activity and a significant increase in SOD activity. Both extracts induced a significant decrease in GSH levels compared to the control group and the group treated with ascorbic acid. On the other hand, the MDA level was not influenced. The anti-inflammatory activity of both extracts is also evaluated *in vivo* and *in vitro*. Topical application of 2 mg/ear of E.AE or E.But reduced ear edema induced by croton oil by 74% and 66% respectively. These values are higher than those obtained with indomethacin (53%) used as reference product. Similarly, both extracts (1mg/ear) inhibit leukocyte migration with 85.45% and 80.49% respectively. *In vitro*, both extracts prevented BSA denaturation and inhibited the erythrocytes hemolysis by 96% and 97% for E.AE and E.But respectively against 98% exerted by diclofenac. These results show that both extracts of *Arbutus unedo* have antioxidant and anti-inflammatory activities that could be exerted by their bioactive compounds. Indeed, phytochemical analysis revealed that these extracts are rich in polyphenols and flavonoids. Thus, *Arbutus unedo* plant could be exploited as a potential source of bioactive compounds with high antioxidant and anti-inflammatory activities.

**Key words:** Anti-inflammatory, Antioxidant, *Arbutus unedo*, Flavonoids, Polyphenols.

# LISTE DES ABREVIATIONS

**AINS** : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

**AIS** : Anti-inflammatoires stéroïdiens

**ASK-1**: Signal d'apoptose regulant la Kinase-1

**BHT**: 2, 6 di-tert-butyl-4-methylphenol

**CAT**: Catalase

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**COX** : Cyclooxygénase

**DL<sub>50</sub>** : Dose létale 50

**DPPH** : 2,2-diphenyl-2-picryl-hydrazyl

**E.AE** : Extrait d'acétate d'éthyle

**E.But** : Extrait butanolique

**EAG** : Equivalent d'acide gallique

**ELAM** : Molécules d'adhérence des leucocytes endothéliales

**EQ** : Equivalent quercétine

**ERK** : Kinases régulées par un signal extracellulaire

**GSH** : Glutathion

**LC-ESI/MS** : Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric

**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%

**ICAM** : Molécule d'adhésion intercellulaire

**IFN- $\gamma$**  : Interféron  $\gamma$

**IL** : Interleukine

**iNOS** : Oxyde nitrique synthase inductible

**I $\kappa$ B** : Inhibiteur de  $\kappa$ B

**JNK** : Kinase-c-Jun N-terminal

**LOX** : Lipoxygénase

**LTB<sub>4</sub>**: Leucotriène B<sub>4</sub>

**MAPK** : Protéine Kinase Activé par les agents Mitogènes

**MDA**: Malondialdéhyde

**MPO**: Myéloperoxydase

**NADPH-oxidase** : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

**NF- $\kappa$ B** : Facteur nucléaire-  $\kappa$ B

**NO** : Monoxyde d'azote

**OCDE** : Organisation de Coopération et de Développement Economiques

**PAF** : Facteur d'activation plaquettaire

**PAL** : Phosphatase alcaline

**PG** : Prostaglandine

**PKC** : protéine kinase C

**PLA2** : Phospholipase A2

**PMN** : Polymorphonucléaire neutrophile

**SD** : Standard déviation

**SEM** : Erreur standard de la moyenne

**SOD**: Superoxyde dismutase

**STAT** : Transducteur de signal et Activateur de Transcription

**TGF- $\beta$**  : Facteur de croissance transformant  $\beta$

**TNF- $\alpha$**  : Facteur de nécrose tumorale- $\alpha$

**VCAM** : Molécules d'Adhérence des Cellules Vasculaires -1

**XO** : Xanthine oxydase



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Sources de production endogène des radicaux libres.....	4
<b>Figure 2.</b> Fuite d'électrons source de ROS au niveau de la chaîne de transport d'électrons ...	5
<b>Figure 3.</b> Production du radical superoxyde par la xanthine oxydase .....	6
<b>Figure 4.</b> Conséquences du stress oxydatif .....	13
<b>Figure 5.</b> Différents niveaux d'action des antioxydants .....	14
<b>Figure 6.</b> Digramme de classification des antioxydants .....	14
<b>Figure 7.</b> Quenching physique de l'oxygène singlet par les caroténoïdes .....	19
<b>Figure 8.</b> Structure chimique générale des flavonoïdes et leurs différentes classes .....	21
<b>Figure 9.</b> Evolution de l'inflammation aiguë .....	23
<b>Figure 10.</b> Etapes de l'inflammation aiguë .....	24
<b>Figure 11.</b> Processus de résolution et de réparation tissulaire .....	27
<b>Figure 12.</b> Mécanisme d'action des glucocorticoïdes .....	34
<b>Figure 13.</b> Photographie d' <i>Arbutus unedo</i> L. ....	39
<b>Figure 14.</b> Droite d'étalonnage de l'acide gallique.....	44
<b>Figure 15.</b> Droite d'étalonnage de la quercétine .....	45
<b>Figure 16.</b> Profils chromatographiques de l'E.AE (A) et l'E.But (B) d' <i>Arbutus unedo</i> obtenus par LC-ESI/MS.....	57
<b>Figure 17.</b> Cinétique de l'hémolyse érythrocytaire induite par l'AAPH en présence de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE), l'extrait butanolique (E.But) d' <i>Arbutus unedo</i> et du Trolox.....	66
<b>Figure 18.</b> Activité antiradicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) des feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> et du BHT vis-à-vis du radical DPPH.....	69
<b>Figure 19.</b> Activité antiradicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) des feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> et du BHT vis-à-vis du radical ABTS .....	70
<b>Figure 20.</b> Activité anti-radicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) des feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> et du BHT vis-à-vis du radical OH. ....	71
<b>Figure 21.</b> Activité antiradicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) des feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> et du BHT vis-à-vis du radical O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	72
<b>Figure 22.</b> Activité anti-radicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) des feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> et du BHT vis-à-vis du radical H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	74
<b>Figure 23.</b> Cinétique de blanchissement du β-carotène à 470 nm en présence et en absence des extraits des feuilles d' <i>Arbutus unedo</i> et de BHT .....	76

<b>Figure 24.</b> Activité antioxydante des extraits (E.AE et E.But) d' <i>Arbutus unedo</i> et de BHT dans le système $\beta$ -carotène/acide linoléique. ....	76
<b>Figure 25.</b> Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits (E.AE et E.But) d' <i>Arbutus unedo</i> et du BHT à 500 nm. ....	77
<b>Figure 26.</b> Activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique des deux extraits d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) d' <i>Arbutus unedo</i> et du BHT au temps 96 h et à une concentration de 50 $\mu$ g/ml. ....	77
<b>Figure 27.</b> Pouvoir réducteur des extraits d'acétate d'éthyle et butanolique d' <i>Arbutus unedo</i> et du BHT à 700nm .....	80
<b>Figure 28.</b> Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et l'extrait butanolique (E.But) d' <i>A. unedo</i> sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.....	82
<b>Figure 29.</b> Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et de l'extrait butanolique (E.But) de la partie aérienne d' <i>A. unedo</i> sur l'infiltration des leucocytes vers la poche d'air .....	83
<b>Figure 30.</b> Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et de l'extrait butanolique (E.But) de la partie aérienne d' <i>A. unedo</i> sur la dénaturation de BSA .....	84
<b>Figure 31.</b> Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et de l'extrait butanolique (E.But) de la partie aérienne d' <i>A. unedo</i> sur la lyse des érythrocytes humains induite par un milieu hypotonique .....	85

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Teneur des extraits E.AE et E.But d' <i>Arbutus unedo</i> en polyphénols totaux et flavonoïdes .....	56
<b>Tableau 2.</b> Composés phénoliques identifiés par LC-ESI/MS dans l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et l'extrait butanolique (E.But) d' <i>Arbutus unedo</i> .....	58
<b>Tableau 3.</b> Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et l'extrait butanolique (E.But) d' <i>A. unedo</i> sur la catalase, la SOD, le MDA et le GSH du surnageant hépatique. ....	63
<b>Tableau 4.</b> Activité anti-hémolytique de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE), de l'extrait butanolique (E.But) d' <i>Arbutus unedo</i> et du Trolox à différentes concentrations .....	65
<b>Tableau 5.</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> et de BHT (test de DPPH).....	68
<b>Tableau 6.</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> et de BHT (test d'ABTS).....	70
<b>Tableau 7.</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> et de l'acide ascorbique (test de piégeage du radical hydroxyle).....	71
<b>Tableau 8.</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> et de l'acide gallique (test de piégeage de l'anion superoxyde).....	73
<b>Tableau 9.</b> Valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> et de l'acide ascorbique (test de piégeage de peroxyde d'hydrogène).....	74
<b>Tableau 10.</b> Les EC <sub>50</sub> des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> et du BHT (Pouvoir réducteur).....	79
<b>Tableau 11.</b> Capacité antioxydante totale des extraits E. AE et E. But d' <i>Arbutus unedo</i> .....	81

# Sommaire

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I. STRESS OXYDANT</b> .....	<b>3</b>
I.1. Espèces réactives de l'oxygène .....	3
I.2. Source des espèces réactives de l'oxygène.....	3
I.2.1. Sources endogènes .....	3
I.2.2. Sources exogènes .....	7
I.3. Fonctions physiologiques des ROS .....	8
I.4. Cibles des ROS .....	10
I.4.1. Oxydation de l'ADN.....	10
I.4.2. Oxydation des composés lipidiques.....	10
I.4.3. Oxydation des protéines.....	11
I.5. Stress oxydant et pathologies .....	12
I.6. Défenses antioxydantes .....	13
I.6.1. Antioxydants endogènes .....	15
I.6.2. Antioxydants exogènes .....	17
I.6.3. Effets antioxydants des flavonoïdes .....	21
<b>II. INFLAMMATION</b> .....	<b>22</b>
II.1. Inflammation aiguë .....	23
II.1.1.Phase vasculaire.....	24
II.1.2. Phase cellulaire .....	25
II.1.3. Phase de résolution .....	26
II.2. Inflammation chronique .....	27
II.3. Médiateurs de l'inflammation .....	28
II.3.1. Médiateurs plasmatiques .....	28
II.3.2. Médiateurs cellulaires.....	29
II.4. Inflammation et pathologies.....	32
II.5. Traitement de l'inflammation .....	32
II.5.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens .....	33
II.5.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens .....	34
II.5.3. Anti-inflammatoires naturels.....	35
II.6. Relation stress oxydant et inflammation .....	36
<b>III. ARBUTUS UNEDO L.</b> .....	<b>37</b>

III.1. Classification botanique d' <i>Arbutus unedo</i> .....	38
III.2. Aspect botanique d' <i>Arbutus unedo</i> .....	38
III.3. Composition chimique .....	39
III.4. Activités biologiques .....	40
III.5. Usage traditionnel .....	41
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>43</b>
I. Matériel.....	43
I.1. Matériel végétal .....	43
I.2. Animaux.....	43
I.3. Sang humain et bovin .....	43
II. Méthodes .....	43
II.1. Préparation des extraits.....	43
II.2. Analyses phytochimiques .....	44
II.3. Etude de la toxicité aigue .....	46
II.4. Activité antioxydante <i>in vivo</i> des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> .....	46
II.5. Activité antioxydante <i>in vitro</i> des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> .....	49
II.6. Activité anti-inflammatoire .....	53
II.7. Analyses statistiques.....	55
<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>56</b>
I. Analyses phytochimiques .....	56
I.1. Polyphénols totaux et flavonoïdes .....	56
I.2. Caractérisation phytochimique par LC-ESI/MS .....	56
II. Toxicité aigue .....	60
III. Activité antioxydante <i>in vivo</i> des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> .....	61
III.1. Effet sur la catalase .....	61
III.2. Effet sur SOD .....	61
III.3. Effet sur le MDA.....	62
III.4. Effet sur GSH.....	63
IV. Activité antioxydante <i>in vitro</i> .....	64
IV. 1. Effet protecteur des extraits contre l'hémolyse érythrocytaire .....	64
IV.2. Activité anti-radicalaire .....	68
IV.3. Effet sur la peroxydation lipidique .....	75
IV.4. Pouvoir réducteur.....	79
IV.5. Test phosphomolybdate (PPM).....	80

V. Activité anti-inflammatoire des extraits d' <i>Arbutus unedo</i> .....	81
V.1. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris .....	81
V.2. Effet des extraits sur la poche d'air.....	83
V.3. Effet des extraits sur la dénaturation des protéines.....	84
V.4. Effet des extraits sur la stabilité membranaire des érythrocytes humains.....	84
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>89</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>91</b>

# INTRODUCTION

**INTRODUCTION**

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites par les organismes vivants au cours du métabolisme cellulaire normal lors de la respiration cellulaire et de la lutte contre les agents exogènes. Les ROS agissent comme des médiateurs dans les réactions de défense cellulaire antioxydantes et anti-inflammatoires, elles sont impliquées dans les mécanismes de phagocytose, d'apoptose et de détoxification. Une production excessive de ROS peut endommager diverses biomolécules telles que les protéines, l'ADN et les acides gras polyinsaturés, provoquant des lésions à différents niveaux cellulaires dont certaines favorisent le développement de plusieurs maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, athérosclérose, cancer et vieillissement. L'organisme humain est protégé contre le stress oxydatif, par un système de défense antioxydant complexe qui consiste en un réseau enzymatique et non enzymatique, endogène et exogène qui agissent synergiquement. Pour renforcer le système antioxydant spontané qui peut être défaillant dans certaines conditions, une supplémentation en molécules antioxydantes est nécessaire. Cependant, l'utilisation d'antioxydants synthétiques est associée à des effets secondaires indésirables.

La réaction inflammatoire est un mécanisme de défense nécessaire pour préserver l'intégrité de l'organisme, elle fait intervenir différents types de cellules et nécessite un réseau de communication intercellulaire impliquant de nombreux médiateurs chimiques pro ou anti-inflammatoires qui peuvent entretenir ou modifier la réponse inflammatoire. Une production excessive de ces médiateurs conduit le plus souvent à une activation inappropriée des cellules inflammatoires, générant ainsi des lésions tissulaires graves associées au développement de plusieurs pathologies inflammatoires et auto-immunes comme l'arthrite, l'asthme, l'eczéma, la goutte, la rhinite allergique et les ulcères gastriques et duodénaux.

La production non contrôlée des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote peut initier ou amplifier les processus inflammatoires, conduisant à plusieurs maladies tels que le cancer, le diabète, l'asthme, le vieillissement précoce, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires. La neutralisation de ces espèces par les antioxydants, surtout d'origine naturelle, peut limiter les altérations des biomolécules.

Le traitement de l'inflammation est souvent basé sur l'apport d'anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. Ces molécules synthétiques présentent des risques de toxicité gastro-intestinale et rénale et le risque est d'autant plus important que la posologie est élevée et que le traitement est prolongé. Et c'est ainsi, que la phytothérapie pourrait être proposée comme la meilleure alternative avec des effets secondaires moindres.



En s'appuyant sur cette vision, Il est intéressant d'intensifier l'effort de recherche dans le domaine des plantes médicinales pour développer de nouveaux remèdes naturels contre diverses affections, avec moins d'effets secondaires et un coût plus faible.

Les substances naturelles connaissent un intérêt croissant dans les domaines pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique qui s'orientent vers l'incorporation des molécules d'origine naturelle dans leurs produits. En effet, de nombreuses études ont prouvé que les substances d'origine végétale sont douées de plusieurs activités biologiques y compris l'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire.

De ce fait, ces dernières années plusieurs recherches se sont orientées vers la valorisation des plantes médicinales utilisées traditionnellement pour traiter plusieurs pathologies afin d'homologuer et d'autoriser leurs utilisations sur des bases scientifiques et éviter les utilisations anarchiques de la médecine folklorique.

C'est dans cet objectif que s'inscrit notre travail qui vise à évaluer l'effet antioxydant et anti-inflammatoire de l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique des feuilles d'*Arbutus unedo*, connue en Algérie sous le nom de lendj ou sasnou. C'est une plante largement distribuée dans le nord de l'Algérie et utilisée également en médecine traditionnelle comme remède naturel contre le diabète et l'hypertension artérielle. Elle est aussi connue pour ses vertus diurétiques, anti-hémorroïdaires et antidiarrhéiques. Elle est utilisée également pour les maladies rénales, dermatologiques, urologiques, cardiaques et gastro-intestinales.

Cette étude renferme trois volets:

- \* Le premier est l'étude phytochimique qui consiste en la préparation et l'étude des extraits d'acétate d'éthyle et butanolique des feuilles d'*Arbutus unedo*
- \* Le second est consacré à l'évaluation de l'effet antioxydant des deux extraits par plusieurs tests *in vivo* et *in vitro*.
- \* Le troisième est consacré à évaluer l'activité anti-inflammatoire des extraits étudiés *in vivo* et *in vitro*.

# REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## I. STRESS OXYDANT

Les radicaux libres sont constamment produits dans l'organisme, mais en faible quantité. Ils agissent généralement comme médiateurs cellulaires ou comme élément de défense. Dans les conditions physiologiques normales, un équilibre est établi entre les oxydants et les antioxydants, si cet équilibre est perturbé à la suite d'un défaut du système antioxydant ou d'une carence en antioxydants ou à la suite d'une production excessive de radicaux libres, cela conduit à ce qu'on appelle le stress oxydatif (Favier, 2003). Ce déséquilibre peut endommager certaines macromolécules (acides nucléiques, lipides et protéines), conduisant ainsi à l'apparition de plusieurs maladies (Pisoschi and Pop, 2015; Smaga et al., 2015).

### I.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent être des radicaux libres qui possèdent au moins un électron non apparié sur la couche externe (radical hydroxyl  $\text{OH}^\bullet$ , superoxyde  $\text{O}_2^\bullet$ , le radical peroxy  $\text{ROO}^\bullet$ ) ou des dérivés non radicalaires, dont la réactivité est très élevée comme le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'oxygène singlet  $^1\text{O}_2$  et l'acide hypochloreux  $\text{HOCl}$  (Bala and Haldar, 2013).

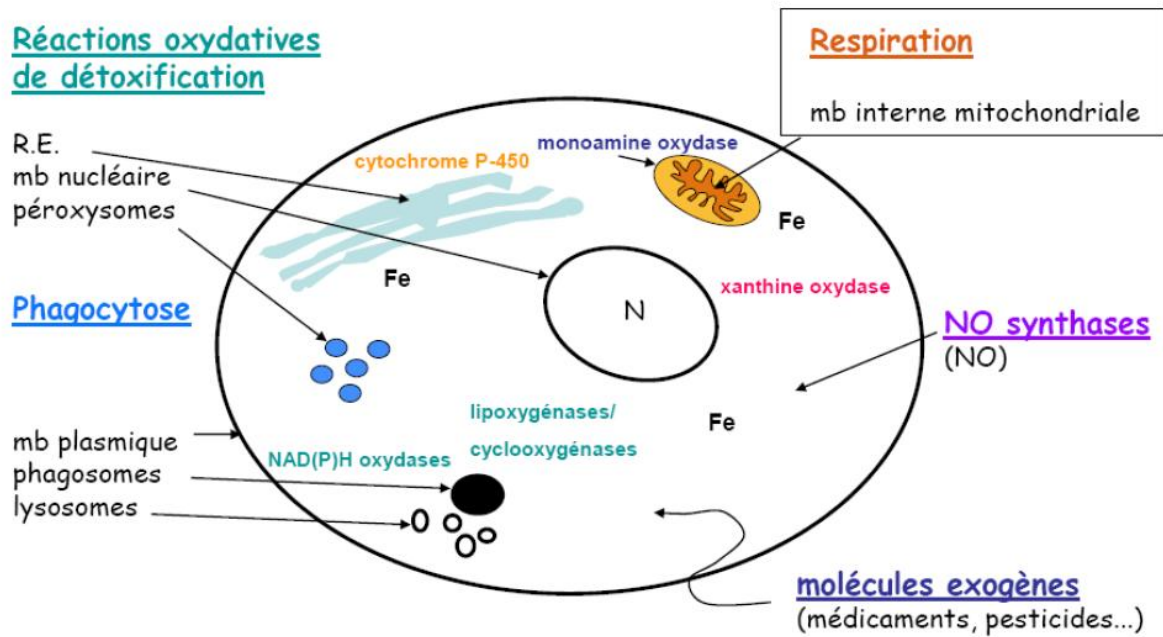
Les espèces réactives de l'azote (RNS) forment un sous-groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (NO) comme le radical monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ), l'anion peroxydite ( $\text{ONOO}^-$ ) et le radical dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2^\bullet$ ), (Sisein, 2014).

### I.2. Source des espèces réactives de l'oxygène

Les ROS, y compris les radicaux libres, apparaissent à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule eucaryote par plusieurs voies dont la principale source est le métabolisme cellulaire (sources endogènes). Le milieu environnemental joue aussi un rôle important dans la production des ROS et des RNS (sources exogènes).

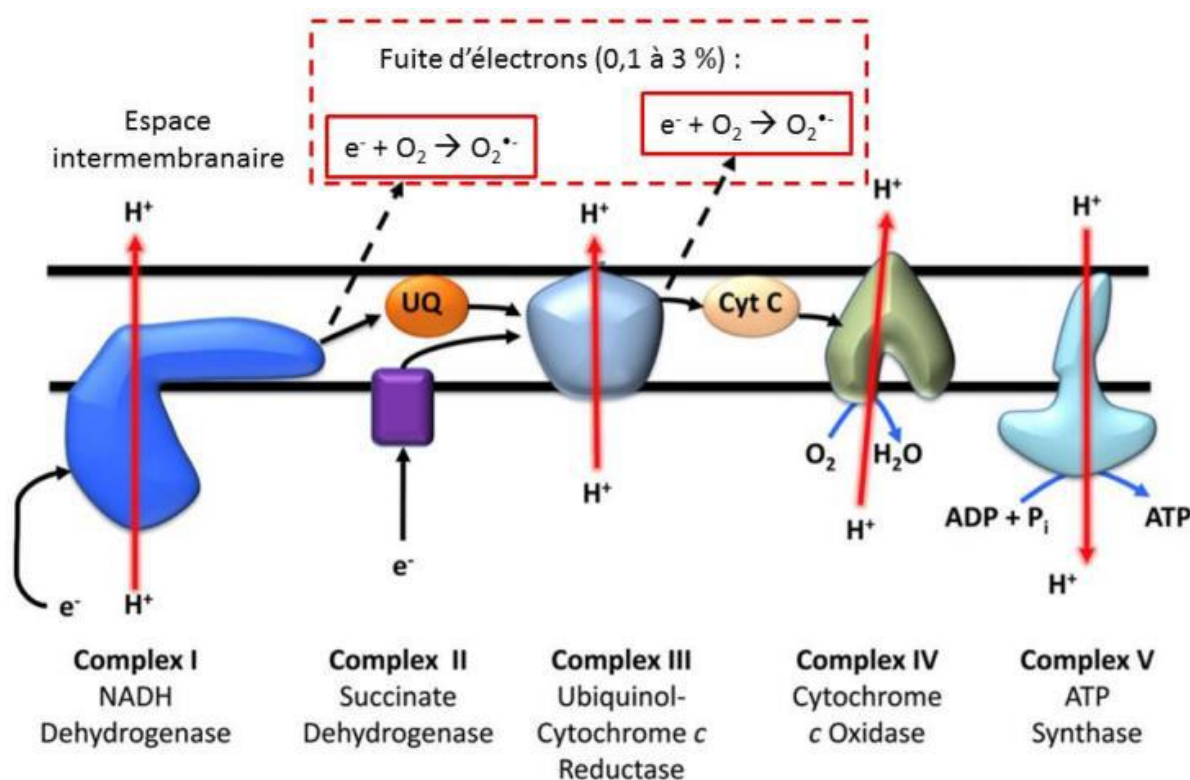
#### I.2.1. Sources endogènes

La production des radicaux libres dans les cellules des mammifères découle de plusieurs sources essentiellement d'origine enzymatique, comme le cytochrome P450, le peroxysome, le micrososome, les réactions catalysées par les métaux ou par les neutrophiles, les éosinophiles et les phagocytes au cours de l'inflammation et également des réactions de transfert d'électrons dans les mitochondries (Casas-Grajales and Muriel, 2015), (**Figure 1**).



**Figure 1.** Sources de production endogène des radicaux libres (Serteyn et *al.*, 2003).

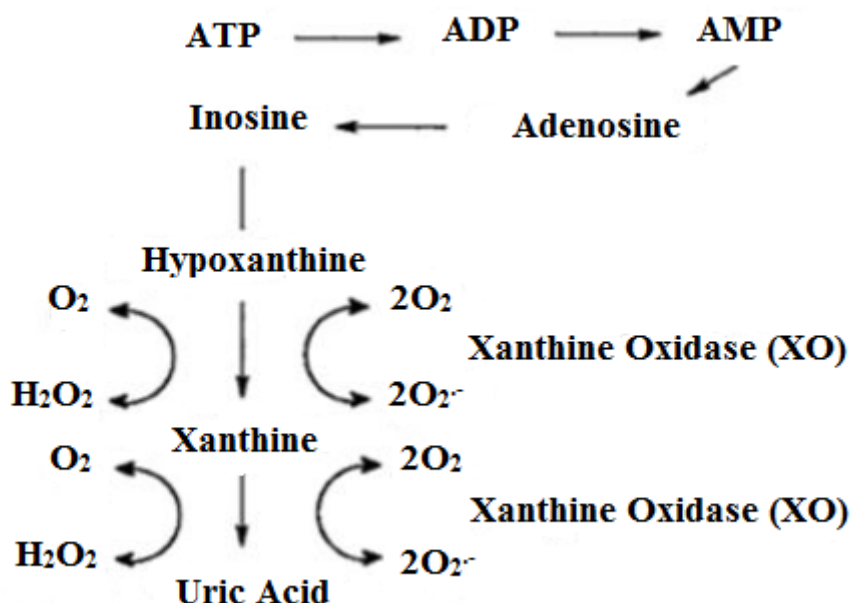
La chaîne respiratoire mitochondriale est responsable de la production d'environ 90% des ROS dans la cellule (Balaban et *al.*, 2005). L'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , résulte de la fuite d'électrons lors de leur transfert par les complexes de la chaîne respiratoire (**Figure 2**), (Valko et *al.*, 2007). La production des ROS par la chaîne respiratoire peut être amplifiée dans certaines conditions physiologiques comme l'hyperglycémie et l'alcoolisme (Beckman and Ames, 1998).



**Figure 2.** Fuite d'électrons source de ROS au niveau de la chaîne de transport d'électrons (UQ : Ubiquinone, Cyt C : Cytochrome C) (Al Ghoulé et *al.*, 2011).

Au cours de l'inflammation, les cellules phagocytaires stimulent une augmentation brutale de la consommation d'oxygène, en activant la NADPH oxydase, ce qui permet de produire de grandes quantités d'anion superoxyde, d'oxyde nitrique et de peroxyde d'hydrogène (Rahman, 2007). Dans les neutrophiles, la NADPH oxydase produit le radical superoxyde nécessaire à la destruction des bactéries (Valko et *al.*, 2004). L'activation simultanée de la NADPH oxydase et de la myéloperoxydase (MPO), conduit à la production de  $^1O_2$  et de l'acide hypochlorique, l'un des puissants oxydants phagocytaires à forte activité microbicide qui amplifie la production des ROS (Steinbeck et *al.*, 1993 ; Serteyn et *al.*, 2003). La NADPH oxydase non phagocytaire (fibroblastes) produit des radicaux libres en faible quantité qui jouent le rôle de régulateurs dans les cascades de signalisation intracellulaire (Bae et *al.*, 1997).

D'autres enzymes sont également productrices de ROS comme la xanthine oxydase (XO) qui joue un rôle important dans le métabolisme des purines. Cette enzyme catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine (**Figure 3**) puis la xanthine en acide urique (Rahman, 2007). Dans les deux réactions, l'oxygène moléculaire est oxydé en  $O^{\cdot-}$  puis en peroxyde d'hydrogène (Terkeltaub et *al.*, 2006).



**Figure 3.** Production du radical superoxyde par la xanthine oxydase (Valko et *al.*, 2004).

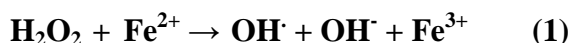
Les enzymes du cytochrome P450 représentent une autre source de production de radicaux libres d'oxygène lors de la détoxification de molécules étrangères. Le cytochrome P450 utilise l'oxygène pour l'oxydation de ces particules étrangères tout en produisant des radicaux superoxydes (Butler and Hoey, 1993). Le foie est le principal organe de production de peroxyde d'hydrogène par les peroxysomes (Rahman, 2007).

De même, les lipooxygénases et les cyclooxygénases représentent une importante source de ROS dans les parois vasculaires (Madamanchi, 2005). La 5-LO catalyse l'oxydation des acides gras polyinsaturés en donnant des hydroperoxydes toxiques pour la cellule, comme elle intervient dans la formation du  $H_2O_2$  par les lymphocytes T en réponse aux interleukines-1 $\beta$  (Droge, 2002). La 12 et 15-lipooxygénase peuvent oxyder les acides gras estérifiés comme ceux retrouvés dans les phospholipides et les stérides (Belkner et *al.*, 1991).

Par ailleurs, des réactions non enzymatiques comme celles catalysées par la présence de métaux de transition réduits (Fe et Cu) représentent d'importantes sources d'espèces hautement réactives (Valko et *al.*, 2007). En effet, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec des métaux de transition résultant en sa dissociation en radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$ , extrêmement réactif qui peut initier de nombreux dommages oxydatifs au niveau des molécules biologiques comme l'ADN, les protéines ou les lipides membranaires (Droge, 2002).

La réaction de Fenton (réaction 1) illustre la dissociation du  $H_2O_2$  en présence du fer ferreux.

De plus, le peroxyde d'hydrogène peut, grâce à la réaction avec l'anion superoxyde, dite réaction de Haber-Weiss, générer le radical hydroxyle (réaction 2).



Encore, la réaction avec l'ubisemiquinone semble être la source la plus importante de la réduction d'oxygène dans les membranes mitochondriales, vu que les mitochondries génèrent environ 2-3 nmol d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ /min/mg de protéine (Rahman, 2007).

Les radicaux libres azotés sont formés par l'intervention de l'oxyde nitrique synthase (NOS) qui catalysent la transformation de l'arginine en citrulline. Ces enzymes (NOSs) existent sous trois formes possibles ; Neuronale (nNOS), endothéliale (eNOS) et inductibles (iNOS). Les deux premières formes existent en permanence dans la cellule et leur activité est régulée par la concentration de calcium intracellulaire. Par contre, les iNOS sont produites dans les phagocytes sous la stimulation des lipopolysaccharides et des cytokines (Valko et *al.*, 2007).

Les cellules du système immunitaire ont la capacité de produire l'oxyde nitrique par l'activation des réactions d'oxydation au cours des réactions inflammatoires. L'oxyde nitrique (NO) peut réagir avec l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) pour produire un radical libre plus réactif, l'anion peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) qui provoque la peroxydation des lipides et l'endommagement de l'ADN.

### I.2.2. Sources exogènes

Des facteurs exogènes liés à l'environnement ou au mode de vie sont également à l'origine d'une accumulation de radicaux libres dans l'organisme.

L'exposition prolongée au soleil (UV) induisent la synthèse d'anions superoxydes, de l'oxygène singlet, de radicaux hydroxyles et de peroxydes d'hydrogène (Martínez-Cayuela, 1995 ; Chen et *al.*, 2012). Les rayonnements X et  $\gamma$  sont capables de générer des radicaux libres en scindant la molécule d'eau (Favier, 2003).

L'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ) présents dans la fumée de cigarette, les radiations ionisantes, les champs électriques et les contaminants industriels, ainsi que l'alimentation chimiquée sont autant d'éléments favorisant la production de ROS qu'une carence en vitamines et oligo-éléments, (Mena et *al.* , 2009). En plus, les polluants atmosphériques constituent une importante source de RNS tels que le  $\text{NO}^\cdot$  et le  $\text{NO}^{\cdot 2}$  qui

causent des dommages directs sur la peau ou après inhalation (Koren, 1995). Ces oxydants sont responsables de l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés des alvéoles pulmonaires en participant à la genèse de radicaux libres. Le  $\text{NO}^\bullet$  et le  $\text{NO}^{\bullet 2}$  peuvent également réagir avec l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène pour former de puissants oxydants comme le  $\text{ONOO}^\bullet$  et le radical  $\text{OH}^\bullet$  (Pincemail et *al.*, 1998 ; Bonnefont-Rousselot et *al.*, 2001).

Les organes et les tissus de l'organisme ne sont pas identiques en termes de production d'espèces radicalaires. Les organes les plus métaboliquement actifs comme les muscles, ou ceux exposés aux rayonnements UV, essentiellement les yeux, seront davantage susceptibles de générer des ROS et des RNS (Droge, 2002).

### I.3. Fonctions physiologiques des ROS

A faible concentration, les espèces pro-oxydantes jouent un rôle physiologique très important. En effet, du fait de leur haute réactivité, ces espèces régulent le phénomène d'apoptose, en entraînant la mort de cellules évoluant vers un état cancéreux (Wang et *al.*, 1999; Soobrattee et *al.*, 2005). Elles activent aussi des facteurs de transcription, activant à leurs tour des gènes impliqués dans la phagocytose (Goldsby et *al.*, 2001). De plus, elles modulent l'expression des gènes de structure codant pour les enzymes antioxydantes (Valko et *al.*, 2007).

La plupart des cellules peuvent produire des radicaux peroxydes, du peroxyde d'hydrogène et de l'oxyde nitrique selon les besoins (Devasagayam et *al.*, 2004). A des concentrations faibles ou modérées, ces radicaux sont nécessaires pour compléter les fonctions de certaines structures cellulaires, et ils sont utilisés également dans le système de défense de l'organisme (Das Sarma et *al.*, 2010). En effet, les cellules phagocytaires (neutrophiles, macrophages et monocytes) produisent des ROS en quantités suffisantes pour détruire les micro-organismes étrangers. Dans ce système, les ROS sont produits par le complexe NADPH qui transforme le  $\text{O}_2$  en  $\text{O}^{\bullet 2-}$  (Kardeh et *al.*, 2014). Ce dernier est ensuite réduit dans le phagosome par la SOD en  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui peut être par la suite converti en  $\text{HOCl}$  par la MPO (Lloyd et *al.*, 2013). Le  $\text{HOCl}$  peut alors former spontanément le  $\text{OH}^\bullet$ . Ces deux molécules hautement réactives sont très toxiques pour les bactéries ingérées par les phagocytes. Le  $\text{HOCl}$  est également un élément important de la défense antimicrobienne et cela par destruction de l'ancrage de l'ADN à la membrane bactérienne, ce qui entraîne l'arrêt de la réplication de l'ADN bactérien (Nordberg and Arnér, 2001).

Le rôle des ROS dans le système immunitaire apparaît clairement chez les patients atteints de la maladie granulomateuse. Ces patients présentent un déficit du système NADPH



oxydase associé à la membrane cellulaire, donc ils sont incapables de produire le radical  $O_2^{\cdot-}$ , ce qui les rend sensibles aux infections et aux inflammations (Pham-Huy et *al.*, 2008).

Les radicaux libres oxygénés et azotés jouent des rôles physiologiques dans certains systèmes de transduction du signal entre les cellules. Leur production par des analogues de la NADPH oxydase dans les cellules non-phagocytaires joue un rôle clé dans la régulation des réactions en chaîne dans différents types de cellules, y compris les cellules endothéliales, les cellules des muscles lisses vasculaires, les cellules du myocarde et celles de la glande thyroïde (Valko et *al.*, 2007).

Les ROS influencent une large classe de molécules de transduction du signal, les MAPK (mitogen-activated protein kinases) qui sont composées de trois sous-familles : les ERK (extracellular signalregulated kinases), les JNK (kinases c-Jun N-terminal) et les kinases p38 (Droge, 2002; Martindale and Holbrook, 2002 ; Hurd et *al.*, 2012). L'activation des ERK en réponse aux ROS favorise généralement la régulation de la prolifération cellulaire (Holbrook and Ikeyama, 2002; Li and Holbrook, 2003). Dans des conditions normales d'oxydo-réduction, la thiorédoxine (Trx) se lie à l'ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) et l'inhibe. Les ROS provoquent la dissociation du complexe Trx-ASK1, conduisant ainsi à l'activation des deux autres familles de MAPK (JNK et p38) par ASK1 (Martindale and Holbrook, 2002). L'activation de ces kinases avec l'interaction des protéines régulatrices de la prolifération conduisent à l'apoptose ou à la nécrose (Kardeh et *al.*, 2014).

L'oxy-nitrite est impliqué dans les réactions de défense non spécifique de la cellule et la destruction des agents pathogènes et des tumeurs. D'autre part, l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène jouent le rôle de second messenger dans la régulation de l'activité cellulaire (Devasagayam et *al.*, 2004) en activant les gènes codant pour le facteur NF $\kappa$ B (Valko et *al.*, 2007), les cytokines TNF, IL1 et IL6, la protéine p21 et certaines enzymes (lipoprotéine lipase, collagénase, aldose réductase, tyrosine, protéine phosphatase et l'ornithine décarboxylase), et en inhibant les gènes codant pour l'activateur du plasminogène et la phosphoénolpyruvate carboxykinase (Favier, 2003).

Les radicaux libres jouent également un rôle important dans le processus de fécondation, du fait que le sperme en sécrète de grandes quantités afin de franchir la membrane plasmique de l'ovule (Haleng et *al.*, 2007).

## I.4. Cibles des ROS

En raison de leur réactivité élevée due à la nature instable, les espèces réactives d'oxygène interagissent avec toute une série de substrats biologiques formant les cellules, notamment l'ADN, les protéines et les lipides (Haleng et *al.*, 2007).

### I.4.1. Oxydation de l'ADN

L'ADN nucléaire et mitochondrial est une cible majeure des ROS. Les altérations les plus communes sont l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques et du squelette désoxyribose par une abstraction d'hydrogène de l'ADN par le  $\text{OH}^{\bullet}$ , provoquant le clivage des brins et des mutations génétiques (Valko et *al.*, 2006 ; Raedschelders et *al.*, 2012; Kardeh et *al.*, 2014). L'altération la plus fréquente de l'ADN est l'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle formant la 8- hydroxy-guanine (8-OHG). Cette dernière se lie à l'adénine au lieu de la cytosine, donnant lieu à des mutations au niveau du matériel génétique, provoquant le vieillissement et l'apparition de certaines maladies comme le cancer (Favier, 2003). Ce produit de l'oxydation de l'ADN peut être facilement dosé dans les urines et est considéré comme un marqueur de lésions nucléiques et de carcinogenèse (Valko et *al.*, 2006 ; Pisoschi and Pop, 2015). Ces altérations de la molécule d'ADN peuvent également conduire soit à l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation, soit à des erreurs de réplication, ou à une instabilité génomique et l'ensemble est associé au phénomène de carcinogenèse (Valko et *al.*, 2006).

De même, les RNS peuvent induire des oxydations de l'ADN. Le monoxyde d'azote et le peroxy-nitrite interviennent dans l'oxydation de la chromatine. De plus, le peroxy-nitrite peut induire la formation de 8-nitroguanine. La majorité des altérations oxydatives de l'ADN sont induites par le radical hydroxyle. Lorsque le peroxyde d'hydrogène échappe aux enzymes de régulation, il peut rejoindre le noyau de la cellule et réagir avec les ions  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{++}$  associés à la chromatine produisant ainsi le radical hydroxyle *in situ* qui attaque l'ADN le plus proche (Valko et *al.*, 2007).

### I.4.2. Oxydation des composés lipidiques

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires riches en acides gras polyinsaturés sont des cibles privilégiées des attaques oxydatives, qui conduisent à la détérioration des membranes (Kardeh et *al.*, 2014; Pisoschi and Pop, 2015), en modifiant leurs fluidité, leur perméabilité et leur excitabilité (Hong et *al.*, 2002).

Initialement, le radical hydroxyle peut attaquer les acides gras insaturés en éliminant un hydrogène de l'un des deux atomes de carbone de la double liaison pour former un radical diène conjugué. Ce dernier réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO<sup>•</sup>) qui peut capter à son tour un proton d'un acide gras insaturé voisin (phase de propagation) pour former un nouveau radical diène conjugué (Valko et *al.*, 2006 ; Kardeh et *al.*, 2014). On parle ici d'une réaction en chaîne de la peroxydation lipidique. Ce processus génère des hydro-péroxydes qui peuvent être désactivés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). Le malondialdéhyde (MDA), les acides thiobarbiturique (TBARS) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont les principaux produits toxiques libérés par les radicaux peroxydes, qui peuvent être utilisés comme indicateurs de la peroxydation lipidique. Donc, un seul événement oxydatif peut altérer de nombreuses molécules lipidiques et induire une accumulation d'hydro peroxydes dans les membranes (Valko et *al.*, 2006).

D'autre part, l'attaque radicalaire sur les lipoprotéines aboutit à la formation de LDL oxydées, qui peuvent se lier aux récepteurs spécifiques sur les macrophages. Ces dernières se transforment progressivement en cellules spumeuses qui ont un rôle important dans les premiers stades de l'athérosclérose. De plus, ces LDL oxydées peuvent activer des complexes immuns issus de la voie classique du complément et provoquent ainsi la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Saad et *al.*, 2006).

#### **I.4.3. Oxydation des protéines**

Les protéines sont des cibles importantes du stress oxydant. Une simple modification structurale d'une protéine peut induire une modification de son fonctionnement. Les protéines oxydées perdent généralement leurs fonction catalytique ou structurale et deviennent plus sensibles à l'action des protéases et sont donc éliminées (Valko et *al.*, 2007). Comme pour les lipides, le radical hydroxyle est le plus réactif et est responsable des différentes altérations oxydatives des protéines. L'oxydation des protéines peut se produire par une carbonylation, une fragmentation ou un mauvais repliement et déploiement, ce qui contribue aux altérations de la fonction des protéines (Pisoschi and Pop, 2015).

L'oxydation des protéines peut également induire des réticulations inter- et intra-protéines et cela par addition d'un groupement lysine sur le groupement carbonyle d'une protéine oxydée, par oxydation d'un groupement thiol des résidus cystéine formant des ponts disulfures ou encore par oxydation des résidus tyrosine formant ainsi des ponts Tyr-Tyr. De plus, la nitration des protéines par addition du peroxy-nitrite sur les fonctions tyrosine peut

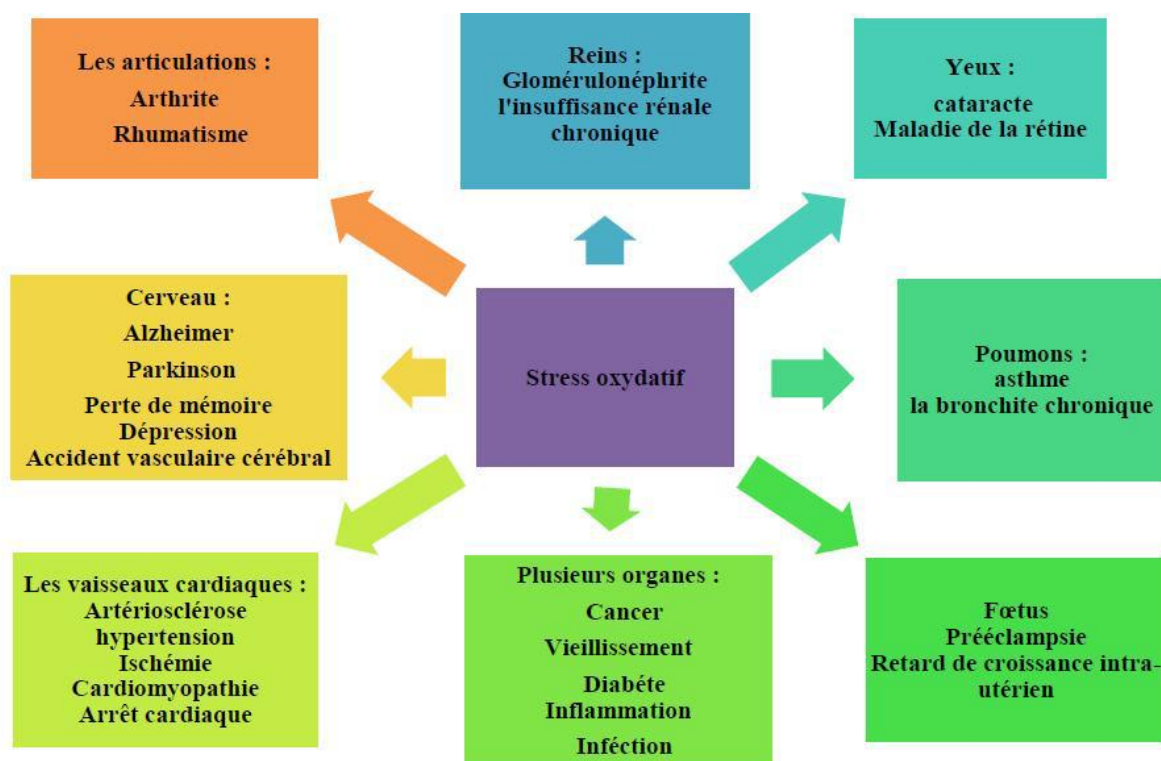
modifier sévèrement la fonction (Baudin, 2006). En effet, la tyrosine est un acide aminé particulièrement impliqué dans les voies de signalisation, en particulier par les réactions de phosphorylation/déphosphorylation. Ainsi le stress oxydant peut avoir un effet sur la fonction propre d'une protéine mais peut également avoir des répercussions sur l'ensemble de la régulation cellulaire (Valko et *al.*, 2006).

Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes soit par suppression de groupements amines ionisables soit par extériorisation des zones hydrophobes centrales et la formation des amas anormaux qui s'accumulent dans ou autour des cellules (Goto and Radak, 2013).

### **I.5. Stress oxydant et pathologies**

Le stress oxydant provoque plusieurs dommages cellulaires qui sont à l'origine de développement de nombreuses pathologies humaines, telles que le cancer, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique, le vieillissement accéléré, le diabète et les désordres rhumatismaux (**Figure 4**), (Pincemail et *al.*, 2002 ; Pham-Huy et *al.*, 2008). Les dérivés toxiques de l'oxygène issus de l'oxydation des lipides et de l'ADN sont impliqués dans le développement des maladies cardiovasculaires et du cancer (Lesgards et *al.*, 2002). Le rôle du stress oxydant dans la relation syndrome métabolique – diabète type II – maladies cardiovasculaires est de plus en plus établi (Kusano and Ferrari, 2008). Les maladies dégénératives également seraient imputables au stress oxydatif généré par les radicaux libres (Lesgards et *al.*, 2002).

Les mécanismes moléculaires du stress oxydant ne sont pas encore bien établis. La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, du fait que le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux libres avec un affaiblissement des systèmes de réparations et de dégradations des produits oxydés (Sohal et *al.*, 2002 ; Phaniendra et *al.*, 2015).



**Figure 4.** Conséquences du stress oxydatif (Nagar *et al.*, 2017).

## I.6. Défenses antioxydantes

Un antioxydant est défini comme une substance qui peut, même à faible dose, retarder de façon significative, ou inhiber l'oxydation d'un substrat naturellement oxydable (Halliwell, 1999). Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les molécules capables de protéger les systèmes biologiques contre les réactions qui engendrent une oxydation excessive (Park *et al.*, 2001).

Les réactions d'oxydation sont multiples et peuvent impliquer des radicaux à la fois initiateurs et propagateurs, c'est pour cela, l'organisme est équipé de plusieurs systèmes de défense afin de lutter contre les dommages oxydatives (**Figure 5**). Certains antioxydants agissent préférentiellement en supprimant ou en diminuant la formation des radicaux libres, ce sont surtout les enzymes antioxydantes qui catalysent des réactions d'oxydoréductions durant lesquelles les radicaux libres seront piégés. D'autres antioxydants agissent d'avantage sur les radicaux formés à partir des réactions des molécules biologiques avec les radicaux libres. Ces antioxydants réduisent ou inhibent ainsi la propagation des réactions d'oxydation en chaîne. Ceux-ci peuvent agir à différents niveaux des réactions d'oxydation (Pietta, 2000). D'autres antioxydants permettent de réparer les dommages causés par les réactions d'oxydation donc ils agissent à postériori en réparant les dégâts grâce à l'action de certaines lipases, protéases, transférases ou enzymes de réparation de l'ADN (Pietta, 2000).

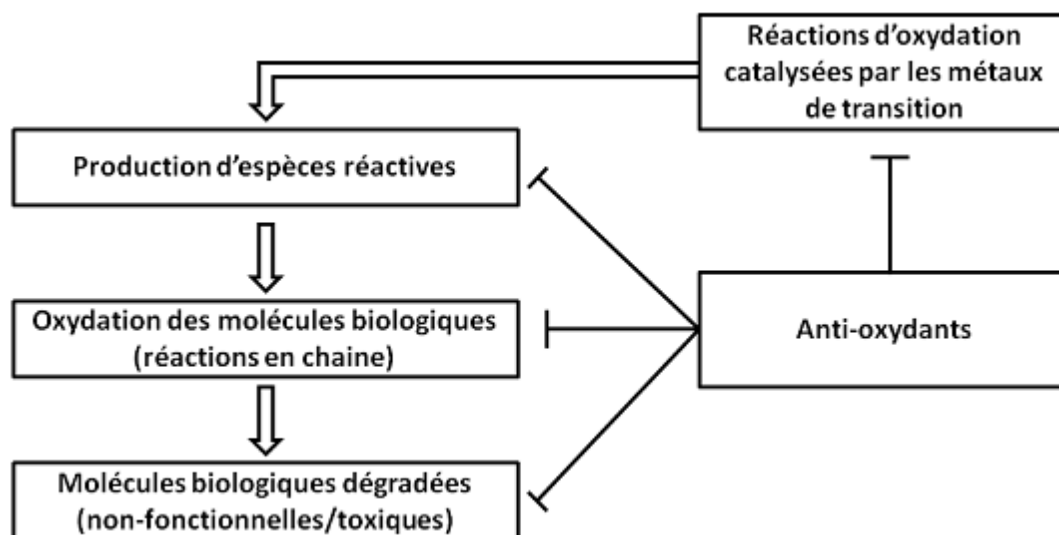


Figure 5. Différents niveaux d'action des antioxydants (Pietta, 2000).

L'organisme utilise un ensemble d'antioxydants endogènes et exogènes (Figure 6) qui servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour les neutraliser et minimiser leurs effets délétères (Lobo et al., 2010).

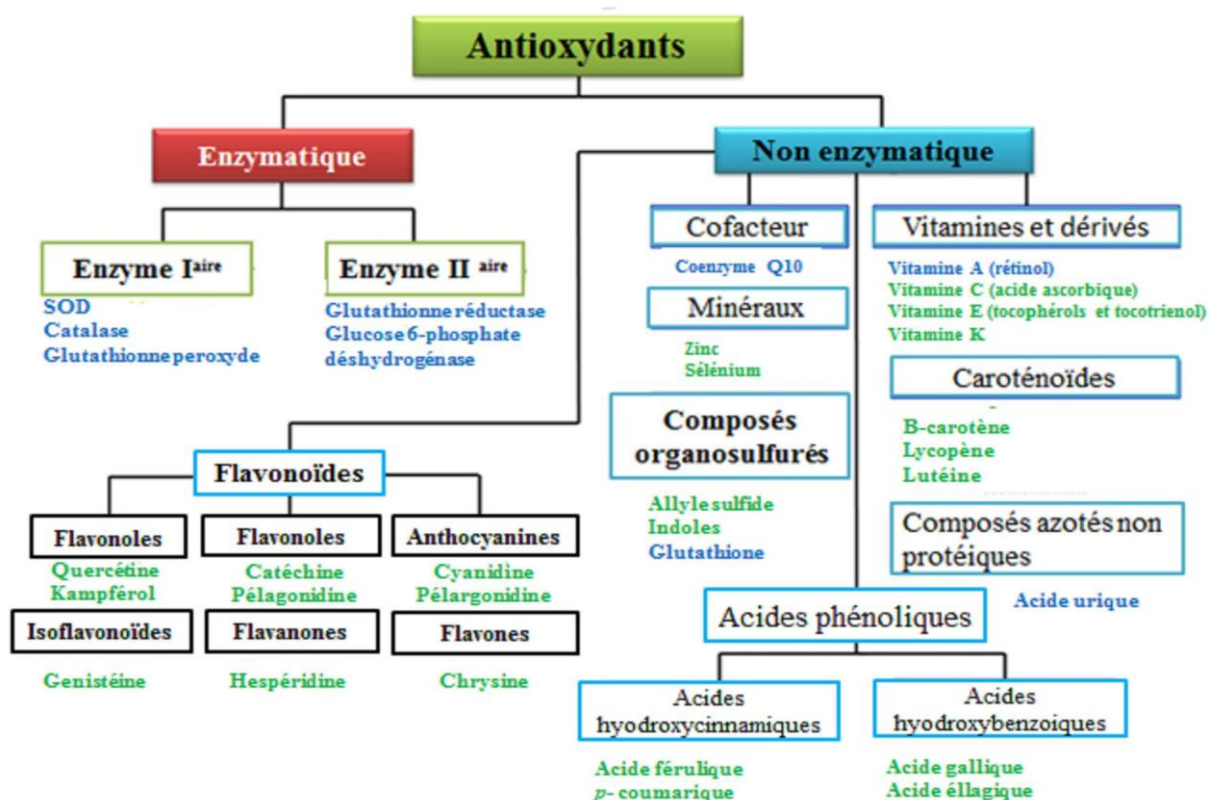
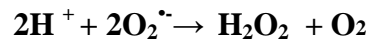


Figure 6. Digramme de classification des antioxydants, en vert : antioxydants exogènes, en bleu : antioxydants endogènes (Godman et al., 2011).

### I.6.1. Antioxydants endogènes

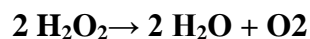
Les antioxydants endogènes comportent des enzymes antioxydantes, représentées principalement par la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (GPX et GR), en plus des thioredoxines, et des peroxiredoxines (Birben et *al.*, 2012). Les enzymes antioxydantes sont très performantes dans la détoxification des radicaux libres et des ROS. En plus d'éliminer directement les ROS, ces enzymes participent également à la régulation du stress oxydant (Sayre et *al.*, 2005).

Le super oxyde dismutase (SOD), est une métalloprotéine qui existe sous trois formes ; la SOD cytosolique (Cu- et Zn-dépendante), la SOD mitochondriale (Mn-dépendante) et la SOD extracellulaire. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en eau oxygénée moins toxiques (Landis and Tower, 2005 ; Alfonso-Prieto et *al.*, 2009).

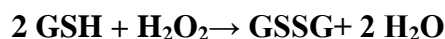


Le peroxyde d'hydrogène formé peut être à son tour éliminé par la catalase et/ou la glutathion peroxydase.

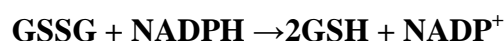
La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle se trouve surtout au niveau des globules rouges et des hépatocytes. Elle catalyse la réaction de détoxification du  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sisein, 2014).



La glutathion peroxydase (GPX) est une enzyme sélénium dépendante qui se trouve dans le cytoplasme où elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'état redox physiologique intracellulaire des cellules vasculaires. Elle catalyse la réduction de peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme substrat donneur d'hydrogène et le transforme en glutathion oxydé (GSSG).



A l'aide d'une glutathion réductase (GR) et de NADPH, le GSH sera régénéré à partir du GSSG (Valko et *al.*, 2007).



La thioredoxine (TRX) est une enzyme présente dans toutes les cellules vivantes, elle possède un site actif conservé (Cys-Gly-Pro-Cys). Dans sa forme réduite elle contient deux groupements thiol adjacents qui se transforment en unité disulfure à l'état oxydé TRX (Sisein, 2014). Ces enzymes interviennent dans la dégradation des peroxydes lipidiques et du

peroxyde d'hydrogène et dans la régénération de l'acide ascorbique à partir du radical ascorbyl (Haleng et *al.*, 2007).

En plus des enzymes, l'organisme dispose d'autres composés endogènes de faible poids moléculaire qui sont capables de prévenir les dommages oxydatifs et qui interviennent sur les molécules pro-oxydantes de façon directe, en cédant leurs électrons aux radicaux libres, ou indirectement, en chélatant les métaux de transition, empêchant ainsi la réaction de Fenton. Ils peuvent être soit des produits de synthèse (glutathion, histidine dipeptide), des produits issus du métabolisme cellulaire (acide urique), ou des protéines telles que la ferritine, la ceruloplasmine et l'albumine qui contribuent à leur tour dans la défense antioxydante secondaire en chélatant les métaux de transition, prévenant ainsi la formation du radical hydroxyle (Martinez-Cayueta, 1995; Masella et *al.*, 2005; Birben et *al.*, 2012). Du fait de leur petite taille, ces antioxydants peuvent pénétrer facilement dans les cellules et se localisent à proximité des cibles biologiques.

Le glutathion, l'un des antioxydants avec un groupement thiol, est un tripeptide (Glu-Cys-Gly), présent essentiellement dans le cytosol, le noyau et les mitochondries. La capacité antioxydante de ce composé est due à l'atome de soufre qui s'adapte facilement à la perte d'un électron. Le glutathion agit comme cofacteur pour plusieurs enzymes détoxifiantes, il participe au transport des acides aminés à travers la membrane plasmique et élimine directement les radicaux hydroxyles et l'oxygène singlet. De plus, le glutathion est capable de régénérer les vitamines E et C oxydées en les transformant à leur forme active (Sisein, 2014), il est aussi un agent chélatant, pour les métaux de transition. Au niveau hépatique, il est détoxifiant car il peut se lier aux métaux toxiques comme le mercure et l'arsenic (Clarkson and Thompson, 2000; Lyn Patrick, 2006).

L'albumine aussi contient des groupements thiols possédant des propriétés réductrices qui facilitent l'élimination des radicaux libres dans le plasma (Haleng et *al.*, 2007).

L'acide urique est l'un des meilleurs antioxydants du plasma, il couvre 35-60% de la capacité antioxydante totale (Johnson et *al.*, 2009). Il peut être oxydé en différents produits dont le prédominant est l'allantoïne qui augmente dans les muscles en cas d'effort (Hellsten et *al.*, 2001), et qui sera régénéré ensuite par la vitamine C (Vasconcelos et *al.*, 2007).



### I.6.2. Antioxydants exogènes

En plus des antioxydants endogènes, d'autres mécanismes de lutte contre les radicaux libres entrent également en jeu. Il s'agit de nombreuses molécules exogènes fournies par une alimentation saine et équilibrée, trouvées essentiellement dans les fruits, les légumes, les plantes médicinales et les épices (Huang, 2018), et qui sont capables d'éliminer des composés oxydatifs, ou de stopper les réactions d'oxydations en chaîne, mais avec une spécificité moindre (Birben *et al.*, 2012). Parmi ces molécules, on trouve les vitamines E, C ainsi que des phyto-constituants tels que les polyphénols (flavonoïdes, acides phénoliques et tanins), les caroténoïdes ( $\beta$ -carotène) et autres (Nema *et al.*, 2009).

#### I.6.2.1. Vitamines

Les vitamines sont définies comme étant des molécules organiques présentes dans les aliments qui jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement normal du corps humain (Shahidi and Naczki, 2003). Certaines sont dites essentielles, d'autres non car l'organisme peut les synthétiser, avec encore deux exceptions: la vitamine D qui est synthétisée sous l'action des radiations UV du soleil, et la niacine dont la voie de synthèse dépend du précurseur tryptophane, apporté par l'alimentation (Ball, 2006). Il existe deux classes principales de vitamines, les vitamines liposolubles représentées par la vitamine A, D, E et K mais également des caroténoïdes dotés d'activités provitaminiques A, et les vitamines hydrosolubles comprennent la vitamine C et le groupe des vitamines B à savoir la thiamine (B1), la riboflavine (B2), la niacine (B3), la pyridoxine (B6), l'acide pantothénique (B5), l'acide folique (B9), et la cobalamine (B12).

La vitamine C (acide ascorbique) est considérée comme étant l'antioxydant naturel le plus puissant. Elle joue un rôle de prévention de l'oxydation dans le plasma et les fluides extracellulaires (Comhair and Erzurum, 2002 ; Gülçin, 2012). Elle empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase), (Cuzzocrea *et al.*, 2001). La vitamine C peut agir directement sur les ROS (Comhair and Erzurum, 2002) ou indirectement par son action de régénération de la vitamine E oxydée et du GSH et cela après son oxydation en acide déhydroascorbique et sa transformation en radical ascorbyl (Sayre *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005).

La vitamine E contient un ensemble de molécules organiques possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ), avec une activité antioxydante

variable (Singh et *al.*, 2005) dont la forme  $\alpha$ -tocophérol synthétisée par les plantes qui est la plus active (Gülçin, 2012). C'est le principal antioxydant dans les membranes des cellules, en particulier les membranes mitochondriales (Traber and Atkinson, 2002). Elle limite essentiellement la peroxydation lipidique grâce à son caractère lipophile qui favorise son accumulation dans les tissus gras (Ball, 2006), là où il peut arrêter les réactions en chaîne de la peroxydation lipidique en captant un radical lipidique peroxy (LOO•). Elle devient à son tour un radical moins actif que le LOO• et pourra alors être pris en charge par une autre molécule antioxydante (Evans, 2000 ; Zelek et *al.*, 2010). Par la suite la vitamine E oxydée pourra être reconvertie par la vitamine C mais également par d'autres composés comme la vitamine A, le GSH et l'ubiquinol. La vitamine E peut aussi activer les SOD et les catalases (Margaritis et *al.*, 2003; Lyn Patrick, 2006).

La vitamine B<sub>6</sub> exerce un rôle antioxydant indirect en favorisant la synthèse de la cystéine à partir de la méthionine et ainsi renforcerait la production de GSH (Dalto and Matte, 2017).

La vitamine A, est exclusivement d'origine animale. Cependant, d'autres molécules, appelées vitamères, qui sont dotés de l'activité du rétinol se cachent sous le nom de vitamine A aussi, comme les caroténoïdes provitaminiques A ( $\alpha$ - et  $\beta$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine) qui sont très largement rependus dans le règne végétal (Ball, 2006). Cette vitamine A agit sur les ROS en formant un radical de vitamine A qui pourra agir comme antioxydant en réagissant avec un autre radical pour former un non radical, ou sera régénéré en vitamine A (Clarkson and Thompson, 2000; Fisher-Wellman and Bloomer, 2009). En excès, la vitamine A pourrait agir comme pro-oxydants en favorisant l'oxydation de l'ADN (Van Helden et *al.*, 2009).

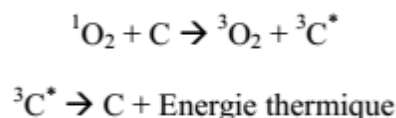
### **I.6.2.2. Caroténoïdes**

Les caroténoïdes sont une classe de pigments naturels présents principalement dans les fruits (Qian et *al.*, 2012). Ce sont des composés liposolubles formés à partir d'unités isoprènes (Rao and Rao, 2007). Les caroténoïdes les plus rependus dans les fruits et les légumes sont le lycopène, la lutéine, le  $\beta$ - et  $\alpha$ -carotène et le  $\beta$ - cryptoxanthine qui représentent plus de 95 % des caroténoïdes retrouvés dans la circulation sanguine (Maiani et *al.*, 2009).

L'activité antioxydante des caroténoïdes repose essentiellement sur le piégeage de l'anion superoxyde ou de radicaux peroxydes. Cependant, le mécanisme principal n'est pas chimique, mais plutôt d'ordre physique. Il s'agit d'un phénomène de quenching physique dans la phase lipidique entre un caroténoïde et un O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ou un <sup>1</sup>O<sub>2</sub> entraînant un transfert d'énergie à partir de ce dernier vers le caroténoïde (**Figure 7**). Il en résulte du dioxygène triplet et un caroténoïde

triplet excité, qui sera capable de dissiper cette énergie et ainsi retrouver son état initial (Stahl and Sies, 1993 ; Stahl and Sies, 2003).

Cette propriété des caroténoïdes est due à leur chaîne carbonée polyinsaturée de structure conjuguée et au nombre de doubles liaisons présentes. Ainsi, plus cette chaîne est longue, plus la dissipation de l'énergie sera facilitée conférant un fort potentiel antioxydant. Enfin, dans certaines conditions particulières de pression partielle en oxygène élevée, ces caroténoïdes peuvent basculer vers une action de type pro-oxydante (Rahman, 2007; Sisein, 2014).



**Figure 7.** Quenching physique de l'oxygène singlet par les caroténoïdes (Stahl and Sies, 1993) (C : caroténoïde ;  $^3\text{C}^*$  : caroténoïde triplet excité)

### I.6.2.3. Polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents dans les plantes et qui jouent un rôle essentiel dans l'attraction des pollinisateurs. Les plantes les utilisent également contre les micro-organismes et les insectes (Li et *al.*, 2012). Ils regroupent plus de 8000 molécules, divisées en une dizaine de classes chimiques qui présentent toutes dans leur structure au moins un cycle aromatique hexagonal mono ou poly-hydroxylé (Tapiero et *al.*, 2002, Tsao, 2010). Les composés phénoliques ; acides phénoliques, flavonoïdes et tannins, forment la classe la plus importante (Beta et *al.*, 2005; Lattanzio, 2013).

Les mécanismes antioxydants des polyphénols dépendent de leur capacité à céder un hydrogène (Sisein, 2014), la chélation des ions métalliques, la diminution de la peroxydation lipidique et la fixation des nitrates en évitant ainsi la formation de composés azotés mutagènes (Li et *al.*, 2012). Cependant, à des concentrations élevées ou à des conditions spécifiques (augmentation de la concentration en ions métalliques, ou pH élevé), les polyphénols deviennent oxydants (Sisein, 2014).

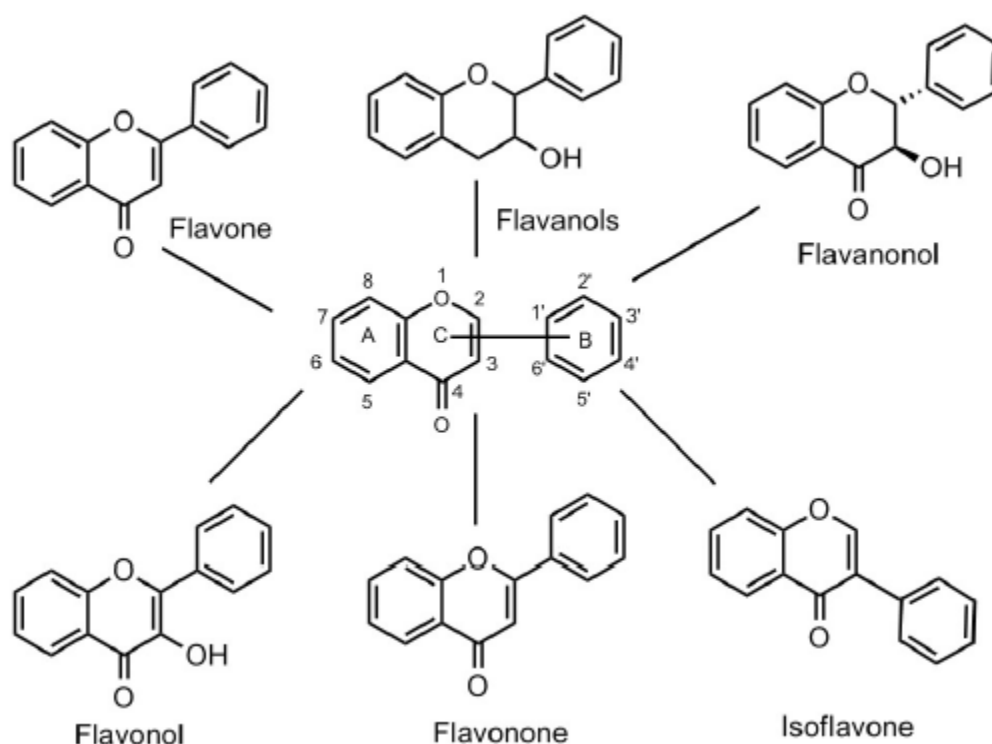
Les acides phénoliques (acide chlorogénique, caféique, protocatéchique, vanillique, férulique, sinapique et gallique) contenus dans certaines plantes médicinales (Hale, 2003; Psotová et *al.*, 2003) sont considérés comme des antioxydants.

Les flavonoïdes forment la classe la plus large de métabolites secondaires des végétaux (plus de 5000 molécules isolées), (Pietta, 2000; Sisein, 2014). Ils contiennent deux cycles benzéniques liés entre eux par un cycle pyrane hétérogène, et diffèrent entre eux par leurs

sites de fixation de groupements hydroxyle, méthoxyle et glycosidique s'il existe. Les flavonoïdes comprennent plusieurs sous-groupes y compris les flavones, les flavonols, les flavanones, les flavanonols et les anthocyanins (**Figure 8**), (Rahman, 2007).

Ces molécules agissent de différentes façons soit par effet scavenger directe (Quinones et *al.*, 2013), soit par chélation de métaux de transition empêchant ainsi la réaction de Fenton (Rodrigo et *al.*, 2011) ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production de ROS comme la xanthine oxydase (Halliwell, 1994; Jayasena et *al.*, 2013). De nombreuses études menées sur des flavonoïdes naturels ont démontré que leur activité antioxydante est due à la présence de certaines structures chimiques dans les flavonoïdes comme les groupements hydroxyles et les groupements O-méthyle (Bubols et *al.*, 2013). Le groupement hydroxyle libre donne un atome d'hydrogène à la molécule radicalaire en la transformant ainsi en une molécule stable, tout en donnant un radical phénoxye relativement stable. L'élimination des radicaux libres d'oxygène et d'azote par les flavonoïdes est due principalement aux groupements hydroxyles de leur cycle B dont ils donnent un hydrogène et un électron au radical hydroxyle, radical peroxye et au radical peroxy-nitrite ce qui conduit à la stabilité de ces radicaux et l'apparition d'un radical flavonoïde relativement stable (Heijnen et *al.*, 2001).

La présence des groupements O-méthyles est également une propriété de l'activité antioxydante des flavonoïdes du fait que les flavones méthylés sont plus stables au cours de leur métabolisme hépatique et ils ont une absorption intestinale plus élevée. Ces propriétés sont observées avec le 5,7- diméthoxyflavone et le 5,7,4- triméthoxyflavone (Walle et *al.*, 2007)



**Figure 8.** Structure chimique générale des flavonoïdes et leurs différentes classes (Banjarnahor and Artanti, 2014).

### I.6.3. Effets antioxydants des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent prévenir les dommages oxydatifs causés par les ROS et les RNS par différentes façons.

#### I.6.3.1. Effets direct sur les radicaux libres

Les flavonoïdes affectent directement les radicaux libres en interagissant avec la partie la plus active du radical par leurs fonctions hydroxyles hautement actives et ainsi le radical devient inactif. Certains flavonoïdes peuvent éliminer directement les anions superoxydes, d'autres flavonoïdes peuvent éliminer le radical peroxyde hautement réactif qui oxyde les LDL et détruit les lipides des membranes plasmiques. L'épicatéchine et la rutine ont aussi un fort effet inhibiteur ; l'effet de la rutine est peut-être dû à son activité inhibitrice de la xanthine oxydase (Nijveldt et *al.*, 2001). La silibine inhibe également le radical NO de manière concentration-dépendante (Dehmlow et *al.*, 1996).

#### I.6.3.2. Inhibition de la xanthine oxydase

En phase de congestion, la xanthine oxydase réagit avec les molécules d'oxygène en produisant des radicaux peroxydes. La quercétine et la silibine activent cette enzyme et réduisent ainsi les dommages causés par le stress oxydatif (Chang et *al.*, 1993). Cos et ses

collaborateurs (1998) ont montré dans une étude menée sur 10 flavonoïdes que le flavone lutéoline est le plus efficace pour l'inhibition de la xanthine oxydase.

#### **I.6.3.3. Chélation des métaux**

La peroxydation lipidique résulte de l'interaction des ROS avec le fer selon la réaction de fenton. La quercétine inhibe la chélation du fer en inhibant ainsi directement la peroxydation des lipides (Durga et *al.*, 2014).

#### **I.6.3.4. Activation des enzymes antioxydantes**

L'activation des enzymes antioxydantes est un autre mécanisme par lequel les flavonoïdes agissent comme antioxydants. Parmi ces enzymes on trouve les UDP-glucuronosyl transférases, les sulfotransférases, les N-acétyltransférases, glutathion S-transférases et méthyltransférases (Banjarnahor and Artanti, 2014). La silymarine est un flavonoïde qui peut réduire le taux de peroxydation lipidique en augmentant l'activité de la superoxyde dismutase, de la glutathion peroxydase et de la catalase (Soto et *al.*, 2003)

#### **I.6.3.5. Diminution de la libération des peroxydases**

Les flavonoïdes peuvent réduire la libération de l'enzyme peroxydase ; Cette réduction inhibe la production de radicaux libres d'oxygène par les neutrophiles en interférant avec l'activation de l'antitrypsine  $\alpha$ -1 (Nijveldt et *al.*, 2001). Ils peuvent agir également en réduisant le stress oxydatif lié à l'oxyde nitrique et l'augmentation des taux d'acide urique, ou en améliorant les propriétés antioxydantes des antioxydants de faible poids moléculaire (Hussain et *al.*, 2016).

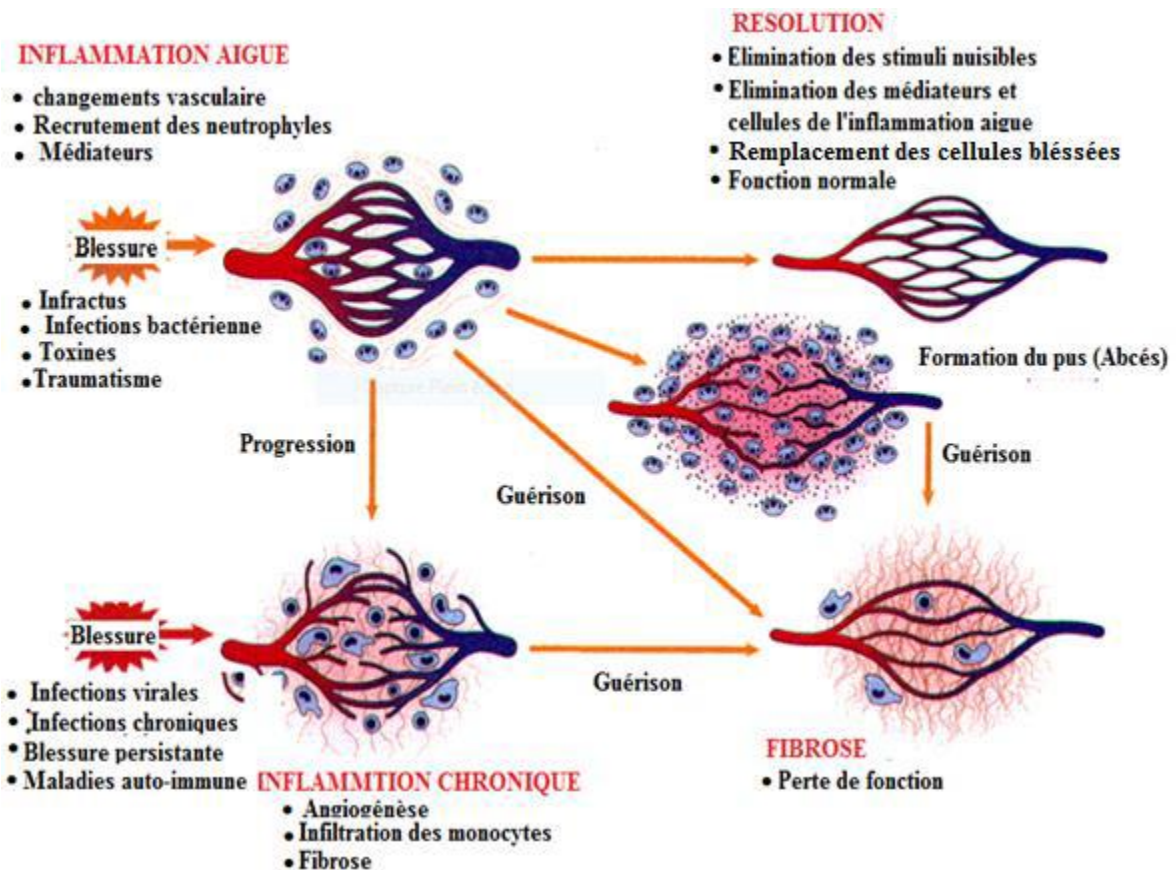
## **II. INFLAMMATION**

L'inflammation est une réponse naturelle des tissus vivants à une agression physique, chimique ou biologique. Elle consiste en un ensemble de mécanismes moléculaires et cellulaires par les quelles l'organisme vise à éliminer et isoler rapidement l'agent envahissant du reste du corps et réparer les tissus endommagés pour revenir à son état physiologique. Dans ce cas, l'inflammation est dite aiguë (Noack and Kolopp-Sarda, 2018). Cependant, si la réaction inflammatoire n'est pas contrôlée, elle peut s'étendre au reste de l'organisme via la circulation sanguine et devient alors une inflammation chronique à des effets néfastes (**Figure 9**), (Weill et *al.*, 2003; Saibabu et *al.*, 2015). Elle est accompagnée par la production de divers

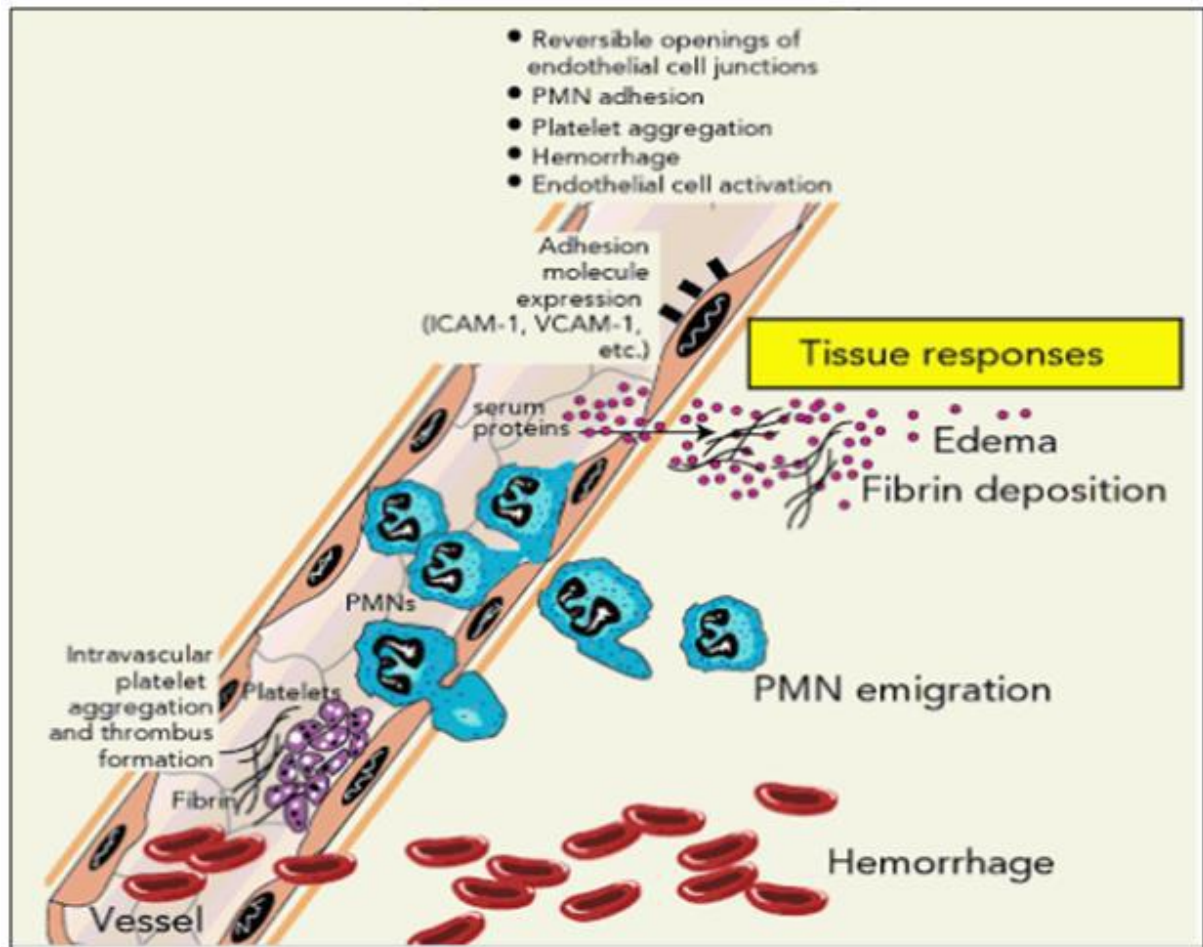
médiateurs inflammatoires tels que les cytokines, les leucotriènes et les prostaglandines (Noack and Kolopp-Sarda, 2018).

### II.1. Inflammation aigue

L'inflammation aigue est une réponse de l'immunité innée qui constitue la première ligne de défense de l'hôte contre les corps étrangers (Fechtner et al., 2017). Elle est immédiate, de quelques jours à quelques semaines d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses qui se traduisent par quatre symptômes cardinaux: œdème, rougeur, douleur et chaleur, qui peuvent également s'accompagner d'atteintes fonctionnelles régionales selon la gravité de l'agression (Janeway et al., 2003). La réponse inflammatoire aiguë se déroule en trois phases; une phase vasculaire immédiate de quelques minutes, caractérisée par des modifications de la microcirculation locale, une phase cellulaire consécutive caractérisée par la mobilisation de nombreuses cellules immunitaires qui permettra l'élimination des micro-organismes pathogènes et des tissus lésés, et enfin une phase de résolution et de cicatrisation qui se déroule en quelques jours et permet la restauration des tissus (**Figure 10**), (Charles et al., 2010).



**Figure 9.** Evolution de l'inflammation aiguë (Kumar et al., 2007).



**Figure 10.** Etapes de l'inflammation aiguë (Ward, 2010).

### II.1.1.Phase vasculaire

Le premier événement de la réaction inflammatoire comporte une vasoconstriction réflexe très courte suivi d'une vasodilatation durable suite à une lésion tissulaire ou à un signal de danger endogène ou exogène, ce qui entraîne une exsudation de liquide plasmatique et donc la formation d'œdème par distension des tissus (Weill et *al.*, 2003; Dorward et *al.*, 2012). Le débit local est augmenté et la perméabilité des capillaires est exacerbée, ce qui entraîne l'extravasation des cellules sanguines (diapédèse), ceci explique en partie la constitution de la chaleur et de la rougeur (Janeway et *al.*, 2003). Au cours de cette phase d'initiation, la coagulation sanguine et le système de complément sont stimulés par la production d'adrénaline, de noradrénaline et de sérotonine qui activent les plaquettes et interviennent dans la génération de divers médiateurs doués d'activités vasodilatatrices et chimioattractantes comme le facteur XII, la fibrine, la bradykinine, C3a et C5a (Fauve and Hevin, 1998). La fibrine agit comme un puissant agent chimiotactique des polynucléaires neutrophiles (Autier et *al.*, 2004), comme elle agit sur la perméabilité vasculaire par son effet sur le système kinines. Les kinines sont des peptides vasoactifs qui augmentent la température



et la douleur. La bradykinine augmente fortement la perméabilité vasculaire et est responsable de la sensation de douleur en interagissant avec des récepteur des neurones sensoriels, il interagit également avec la plasmine pour stimuler la voie du complément en amplifiant la réaction inflammatoire. La bradykinine active aussi la phospholipase A2 qui libère l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires des plaquettes et des cellules épithéliales. Le métabolisme de l'acide arachidonique donne des prostaglandines par la voie des cyclo-oxygénases et des leucotriènes via la voie des 5-lipo-oxygénases. Les prostaglandines (PGE2, PGF2 $\alpha$ , PGD2, PGI2 et TxA2) dilatent les vaisseaux sanguins et sont nociceptifs et participent donc aux symptômes de l'inflammation, tandis que les leucotriènes (LTB4, LTC4 et LTD4) se caractérisent par un fort chimiotactisme pour les polymorphonucléaires (Weill et *al.*, 2003).

Cette phase peut être déclenchée par une autre voie, celle médiée par la substance P et le peptide lié au gène de la calcitonine, sécrétée par Les neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine. Ces deux facteurs induisent, en plus de l'activation des mastocytes, une vasodilatation et une exsudation plasmatique en agissant sur les cellules endothéliales et les muscles lisses des vaisseaux sanguins (Birklein and Schmelz, 2008; Börzsei et *al.*, 2008).

### II.1.2. Phase cellulaire

Les PMNs circulants se marginalisent et adhèrent aux cellules endothéliales. Cette adhérence résulte de l'interaction entre les sélectines de la surface des cellules endothéliales et certains polysaccharides de la surface des polynucléaires. Cette adhérence est faible, laissant les polynucléaires rouler à la surface de l'endothélium. L'adhérence devient ensuite forte et étroite, résultat de la réaction entre les récepteurs des cellules endothéliales VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1 et les intégrines présentes à la surface des polynucléaires (Dorward et *al.*, 2012; Headland and Norling, 2015).

Cette étape fait suite à la réponse vasculaire, elle implique surtout les cellules endothéliales et les leucocytes circulants. Elle est caractérisée par un afflux extravasculaire interstitiel de leucocytes, les polynucléaires neutrophiles (PMNs) dans un premier temps puis les monocytes et leur pénétration dans les tissus endommagés. L'accumulation des neutrophiles atteint son maximum à la 4<sup>ème</sup> heure puis décline rapidement, alors que le nombre de monocytes augmente après la 4<sup>ème</sup> heure et atteint son maximum entre 18 et 24 heures. Les polynucléaires circulants sont attirés vers le foyer inflammatoire par des facteurs chimiotactiques (Dorward et *al.*, 2012; Headland and Norling, 2015). Les monocytes gagnent

le foyer inflammatoire attirés par les facteurs chimiotactiques sécrétés par les neutrophiles où ils se transforment en macrophages. Ces dernières assurent par phagocytose le nettoyage du foyer inflammatoire en cas d'inflammation aiguë et participent à la poursuite du processus inflammatoire en cas d'inflammation chronique par la production de nombreux médiateurs inflammatoires (Iwalewa et *al.*, 2007). Ensuite, les lymphocytes porteurs d'antigènes viennent pour renforcer le processus d'élimination des agents étrangers et les débris cellulaires. Si les deux étapes précédentes sont insuffisantes pour contrôler l'inflammation, l'organisme développe une réponse immunitaire dans laquelle des lymphocytes B et T spécialisées sont activées (Weill et *al.*, 2003).

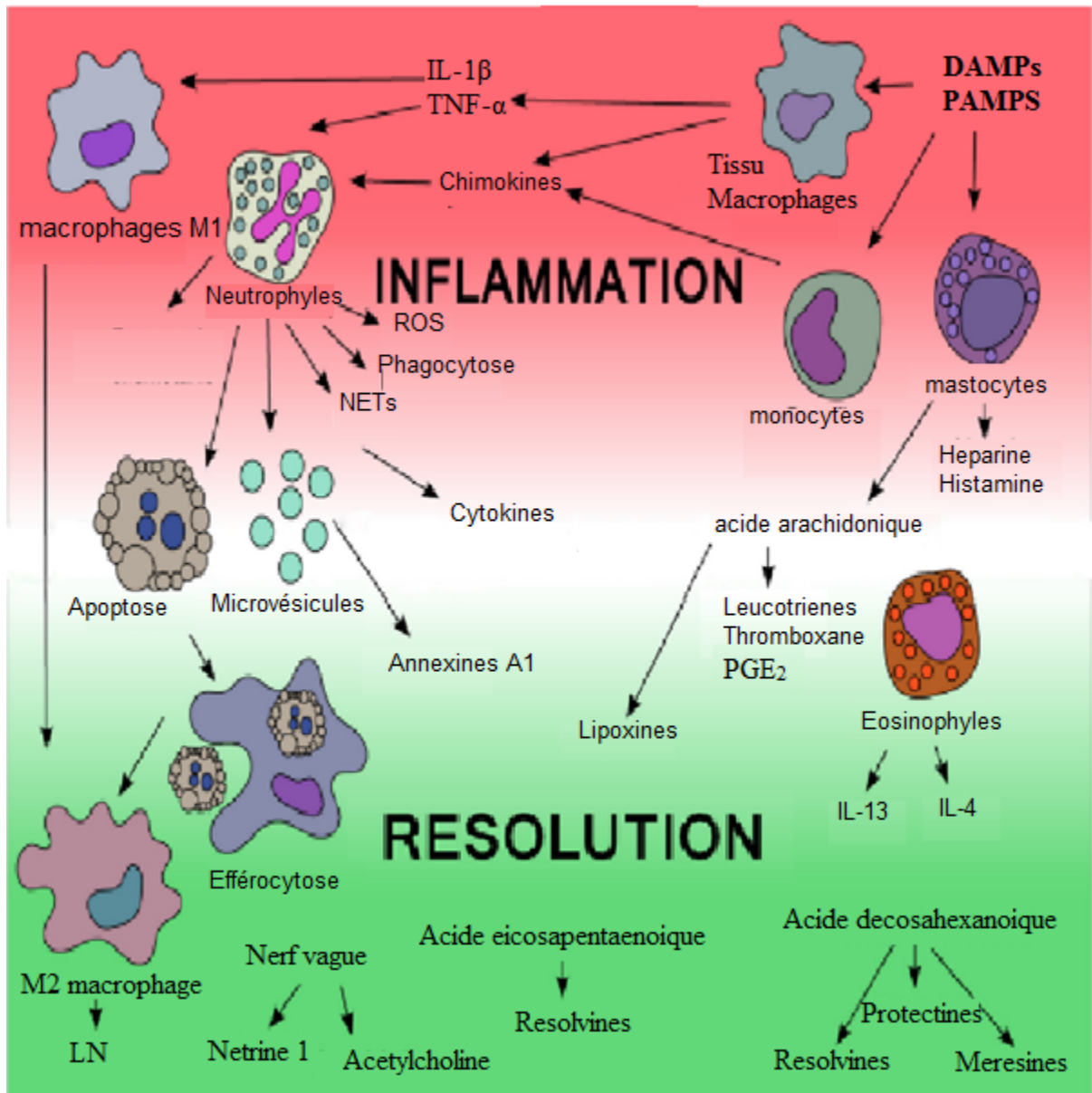
Des protéases (collagénase, élastase) et des radicaux libres dérivés du métabolisme de l'oxygène et du monoxyde d'azote sont produits au cours de la phagocytose. Ces agents destinés à éliminer les microorganismes pathogènes et les débris tissulaires peuvent aussi endommager les tissus sains. Ainsi, de telles atteintes peuvent accompagner les réactions inflammatoires entièrement normales et bénéfiques, et les dommages sont plus importants, d'autant plus que la réaction est plus forte (Fauve and Hevin, 1998; kumar and Pandey, 2013).

### II.1.3. Phase de résolution

La phase de résolution est l'étape de cicatrisation et de restauration, elle est liée au degré d'endommagement des tissus et dépend de la taille et de la profondeur de la lésion (Krishna and Upendra, 2012). Il s'agit de l'arrêt du processus inflammatoire lorsque les microorganismes pathogènes sont éliminés par les polynucléaires et les produits de dégradation et c'est ainsi que les débris cellulaires sont éliminés par les macrophages. A ce moment, les macrophages produisent des cytokines et des médiateurs telles que les lipoxines, les protectines et les resolvines qui jouent un rôle majeur dans la promotion de la résolution du processus inflammatoire (**Figure 11**) et de la réparation tissulaire (Serhan and Savill, 2005; Serhan, 2007). Les lipoxines bloquent l'influx des neutrophiles, facilitent la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et permettent le recrutement de monocytes afin d'éliminer les cellules apoptotiques et les débris cellulaires (Serhan and Savill, 2005). Les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales libèrent les inhibiteurs de protéases, inactivant ainsi les protéases sécrétées par les neutrophiles lors de la phase aiguë de la réponse inflammatoire (Ashcroft et *al.*, 2000). La réparation des tissus fait intervenir aussi les cellules endothéliales et les fibroblastes (Eming et *al.*, 2007). La réparation de l'endothélium est assurée par les cellules endothéliales. Les fibrocytes puis les fibroblastes permettent la reconstruction des tissus en produisant les protéines de la matrice intercellulaire comme le

collagène, la fibronectine et la laminine. Le système d'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire va s'éteindre (Weill *et al.*, 2003).

Le système nerveux parasympathique joue également un rôle important pour stopper la réaction inflammatoire, en activant les macrophages via la libération de l'acétylcholine (Tracey, 2002). Ceci pourrait être liée à la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 et IL-8) et l'induction de l'IL-10 qui est une cytokine anti-inflammatoire (Borovikova *et al.*, 2000).



**Figure 11.** Processus de résolution et de réparation tissulaire (Headland and Norling, 2015).

## II.2. Inflammation chronique

L'inflammation chronique est une inflammation prolongée, qui peut durer plusieurs semaines ou plusieurs années voir se prolonger tout au long de la vie de l'individu (Charles et

*al.*, 2010; Laveti et *al.*, 2013). Au début, les symptômes sont similaires à ceux observés avec une inflammation aiguë, sauf que la destruction des tissus est plus grave avec des complications anatomiques profondes, ce qui conduit souvent à une perte des tissus ou des fonctions des organes (Weill et *al.*, 2003). A la différence de ce qui se passe dans l'inflammation aiguë, les phases vasculaires et cellulaires ne se succèdent pas mais coexistent tout au long de l'évolution de cette réaction. Des phénomènes de destruction tissulaire et de tentative de réparation sont également présents (Lee and Surh, 2012; Howcroft et *al.*, 2013; Park et *al.*, 2014). Les tissus ne se régèrent pas correctement et un phénomène de cicatrisation pathologique s'installe (Weill et *al.*, 2003).

L'inflammation chronique se caractérise par l'infiltration des cellules inflammatoires primaires telles que les macrophages, les lymphocytes et les plasmocytes dans le tissu, et qui produisent des cytokines inflammatoires, des facteurs de croissance et des enzymes, contribuant ainsi à la progression des lésions tissulaires et à la réparation secondaire, y compris la fibrose et la formation de granulomes (Fauve and Hevin, 1998; Weill et *al.*, 2003).

### **II.3. Médiateurs de l'inflammation**

La réponse inflammatoire est initiée, diffusée et contrôlée par de nombreux médiateurs chimiques, pro ou anti-inflammatoires, qui peuvent être synthétisés localement par les cellules inflammatoires telles que les mastocytes, les thrombocytes, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages (médiateurs cellulaires), ou être présents à l'état de précurseurs inactifs dans la circulation sanguine (médiateurs plasmatiques). Un déséquilibre entre ces deux groupes de médiateurs conduit à la chronicité de la réaction inflammatoire et à la destruction des tissus enflammés (Henrotin et *al.*, 2001; Iwalewa et *al.*, 2007).

#### **II.3.1. Médiateurs plasmatiques**

Les médiateurs plasmatiques de l'inflammation sont constitués de trois systèmes interdépendants de protéases plasmatiques, le système de la coagulation, les kinines et le système du complément.

\* Le système coagulation/fibrinolyse: suite à une agression, le facteur XII activé par les facteurs tissulaires déclenche le système de coagulation qui aboutit à la formation de la fibrine. Ce dernier qui est un puissant agent chimiotactique des PMNs, augmente aussi la perméabilité vasculaire en agissant sur la cascade des kinines qui entraînent à leur tour une activation de la phospholipase A2, une irritation des fibres sensorielles au niveau lésionnel (Henrotin et *al.*, 2001). Elle agit sur les kininogènes et sous l'action des kalllicréines produit

de nombreux petits peptides vasoactifs (bradykinine). Ces derniers à leur tour, augmentent fortement la perméabilité vasculaire et induisent la production et l'activation de plusieurs médiateurs inflammatoires notamment le complément (Weill et *al.*, 2003). De même, ce système permet la formation du caillot afin de limiter le foyer inflammatoire et constitue une matrice sur laquelle les cellules immunitaires peuvent se déplacer (Sanchez-Munoz et *al.*, 2008).

\* Le complément: regroupe des protéines sériques, dont beaucoup sont des protéases, activées par les deux voies enzymatiques classique et alterne qui forment la séquence terminale d'éléments lytiques C5 à C9. Au cours de l'inflammation aigue, l'activation des protéines du complément aboutit d'une part à la fixation des opsonines sur les surfaces cellulaires qui seront reconnus par des cellules du système monophagocytaire, facilite donc la phagocytose et la lyse des micro-organismes pathogènes, et d'autre part à la libération de peptides diffusibles (anaphylatoxines C3a, C5a, C2b, C4a, C3b et C5b) qui sont impliqués dans la vasodilatation, dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire, dans le chimiotactisme des PMNs et des monocytes, dans la libération de l'histamine par les mastocytes et les plaquettes, dans la stimulation du métabolisme de l'acide arachidonique, dans l'adhésion des PMNs à l'endothélium vasculaire et enfin dans l'activation de la formation des espèces réactives de l'oxygène. (Henrotin et *al.*, 2001; Weill et *al.*, 2003; Zeghal and Sahnoun, 2013).

### II.3.2. Médiateurs cellulaires

Les principaux médiateurs chimiques cellulaires sont:

\* Les amines vaso-actives (histamines et sérotonine): synthétisées principalement par les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les plaquettes. Elles provoquent l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la vasodilatation (Medzhitov, 2008). L'histamine montre aussi un effet chimiotactique sur les polynucléaires neutrophiles et les éosinophiles en stimulant l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales (Saito et *al.*, 1996).

\* Les cytokines et les chimiokines: Au cours du processus inflammatoire, les cellules inflammatoires, principalement les lymphocytes T, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les plaquettes ou même les cellules épithéliales, secrètent une variété de cytokines et de chimiokines qui régulent plusieurs fonctions physiologiques et pathologiques dans l'organisme telles que les réponses inflammatoires et immunitaires, l'homéostasie et l'hématopoïèse (Henrotin et *al.*, 2001; Sanchez-Munoz et *al.*, 2008). Elles peuvent être pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, ou le TNF $\alpha$ ) ou anti-inflammatoires (IL-10, TGF- $\beta$ 1).

Le TNF- $\alpha$  est la première cytokine libérée lors de la réaction inflammatoire (Weill et *al.*, 2003). Il est synthétisé sous forme d'un précurseur membranaire fortement actif et transformé ensuite en une protéine soluble (TNF- $\alpha$  soluble) aussi actif dans le milieu extracellulaire sous l'action d'une métalloprotéinase de la famille des adamalysines (TNF- $\alpha$  converting enzyme), (Black et *al.*, 1997; Bradley, 2008).

L'IL-1 $\beta$  est synthétisé dans le cytoplasme des monocytes, des macrophages et des neutrophiles sous la stimulation d'un inflammasome (Gabay et *al.*, 2010). Dans les neutrophiles, l'IL-1 $\beta$  peut également être produit sous l'action de sérine-protéases indépendamment de l'inflammasome (Cantagrel et *al.*, 2017).

Le TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  se lient aux récepteurs spécifiques présents dans nombreuses cellules pour exercer leurs effets biologiques. Ces deux cytokines sont à l'origine de la production d'autres cytokines et des chimiokines comme l'IL-2, IL-6 et l'IL-8. Ils induisent le métabolisme de l'acide arachidonique et favorisent la sécrétion des enzymes protéolytiques et des radicaux libres (Borish and Steinke, 2003).

Au niveau des cellules endothéliales, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  induisent l'expression des molécules d'adhésion et des facteurs tissulaires, activant ainsi la migration des cellules vers le site enflammé (Henrotin et *al.*, 2001; Borish and Steinke, 2003). Ils induisent également la synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation par les hépatocytes (Arango Duque and Descoteaux, 2014).

D'autres cytokines comme l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et l'IL-8 amplifient également la réponse inflammatoire. L'IFN- $\gamma$  stimule l'activité lysosomale des macrophages et favorise l'élimination d'agents pathogènes et induit également l'augmentation de l'expression des molécules du CMH I dans les cellules normales et les cellules présentatrice de l'antigène et stimule la migration des leucocytes (Schroder et *al.*, 2004; Baraut et *al.*, 2012).

L'IL-8 est une cytokine majoritaire des neutrophiles qui induit la migration des PMNs, des basophiles et des lymphocytes T vers le site inflammatoire sous l'effet de l'expression des intégrines (Descamps-latscha and witko-sarsat, 1996). Il induit également la dégranulation des neutrophiles et augmente la perméabilité vasculaire et stimule la sécrétion du PAF et du LTB<sub>4</sub> (Weill et *al.*, 2003; Shaikh, 2011).

L'IL-10 est un anti-inflammatoire produit au cours de la réaction inflammatoire, il est synthétisé principalement par les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les macrophages (Saraiva and O'Garra, 2010). Il inhibe la réponse immunitaire de plusieurs

cellules présentatrices de l'antigène comme les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Schneider et *al.*, 2004), comme il inhibe la production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires par ces cellules, notamment, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le GM-CSF et le TNF- $\alpha$  (Takahashi et *al.*, 2000 ; Schneider et *al.*, 2004) et la production d'autres médiateurs pro-inflammatoires comme la PGE2 et le NO (Minghetti et *al.*, 1998).

Le TGF- $\beta$ 1 est une cytokine anti-inflammatoire produite par les lymphocytes, les plaquettes et les monocytes/macrophages (Shaikh, 2011). Il est impliqué dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire (Byrne and Reen, 2002) en inhibant la prolifération et la différenciation cellulaires ainsi que la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IFN- $\gamma$ , IL-2) et des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Goulart et *al.*, 2000; Shaikh, 2011).

\* Les médiateurs lipidiques : Au cours de la réaction inflammatoire et sous l'action de certaines cytokines (IL-1 et TNF- $\alpha$ ), les prostaglandines (PGE2, PGF2a, PGD2, PGI2) et les leucotriènes (LTB4, LTC4 et LTD4) sont produits à partir de l'acide arachidonique. Les leucotriènes augmentent la perméabilité capillaire et exercent une chimioattractivité sur les polynucléaires, tandis que les prostaglandines produisent une vasodilatation locale. Ces effets contribuent directement ou indirectement à l'érythème, l'œdème, la douleur et à la fièvre (Henrotin et *al.*, 2001; Weill et *al.*, 2003).

\* Les neuropeptides: L'activation des leucocytes au cours de l'inflammation conduit à la libération de différents types d'enzymes (élastase, collagénase, hydrolases acides) douées d'activité lytique et de protéines (défensines, cathepsine-G, azurocidine, MPO, lactoferrine) caractérisées par un puissant effet antimicrobien et bactéricide, capables de détruire les agents pathogènes et d'établir l'hémostase (Hurtado-Nedelec et *al.*, 2014).

La MPO est une enzyme qui détruit une grande variété de microorganismes, en se fixant sur leurs membranes à de nombreux sites où existent des structures polysaccharidiques, résistantes aux enzymes protéasiques et hydrolytiques (Serteyn et *al.*, 2003). Elle catalyse la transformation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence des ions de chlore en radical HOCl, capable de faire la chloration et la nitration en attaquant une large gamme de molécules (groupes aminés, centres Fe-S, groupements thiol, lipides insaturés et bases nucléiques), (Saran et *al.*, 1999; Serteyn et *al.*, 2003).

De même, la stimulation des fibres afférentes du nociception A $\delta$  et C, induit la libération des neuropeptides stockés dans l'extrémité axonale de ces fibres. La substance P est le principal neuropeptide qui agit sur plusieurs cellules du foyer inflammatoire, possèdent des

récepteurs membranaires pour la substance P, à savoir les cellules endothéliales, les lymphocytes, les macrophages, les mastocytes et les fibroblastes. Il augmente la perméabilité vasculaire, stimule la production du NO et le P-sélectine par les cellules endothéliales, stimule le chimiotactisme des neutrophiles et la production de prostaglandines par les macrophages (Henrotin et *al.*, 2001). La substance P stimule aussi l'angiogenèse et la prolifération des kératinocytes, des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des fibroblastes (Ziche et *al.*, 1990; Henrotin et *al.*, 2001).

\* PAF (Platelet Activating Factor): Il stimule l'agrégation plaquettaire, augmente la perméabilité vasculaire et active les leucocytes (Henrotin et *al.*, 2001).

#### **II.4. Inflammation et pathologies**

L'inflammation est à l'origine de développement de diverses maladies humaines telles que le cancer, le diabète de type II, l'arthrite, les maladies auto-immunes, les complications cardiovasculaires, l'athérosclérose, les maladies pulmonaires, l'asthme, l'ostéoporose, les maladies neuro-dégénératives, et les maladies inflammatoires de l'intestin (Lee and Surh, 2012; Saibabu et *al.*, 2015; Chen et *al.*, 2018). Les cytokines pro-inflammatoires sont largement impliquées dans ces pathologies en amplifiant la réaction inflammatoire via la néo-vascularisation, l'hyper-prolifération cellulaire et la dégradation tissulaire (Noack and Kolopp-Sarda, 2018). La production continue de cytokines et de chimiokines favorise le maintien des cellules inflammatoires hautement actives sur le site inflammatoire dans différentes maladies chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis et les maladies chroniques de l'intestin (Libby, 2007; Lowe et *al.*, 2011). La détection des facteurs de transcriptions tels que le facteur nucléaire kappa-B (NF- $\kappa$ B), STAT et leurs produits géniques tels que la COX-2, les cytokines, les chimiokines et les récepteurs des chimiokines dans un grand nombre de maladies montre le rôle de l'inflammation dans les maladies chroniques (Laveti et *al.*, 2013).

#### **II.5. Traitement de l'inflammation**

Le traitement classique de l'inflammation repose sur l'utilisation des molécules de synthèse, les anti-inflammatoires synthétiques, qui inhibent ou bloquent le processus inflammatoire en se focalisant sur les mécanismes moléculaires de la réaction inflammatoire. Les propriétés anti-inflammatoires de ces molécules résultent essentiellement de l'inhibition de la synthèse de nombreuses protéines pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion, COX-2, NO-synthase) impliqués dans l'amplification du processus



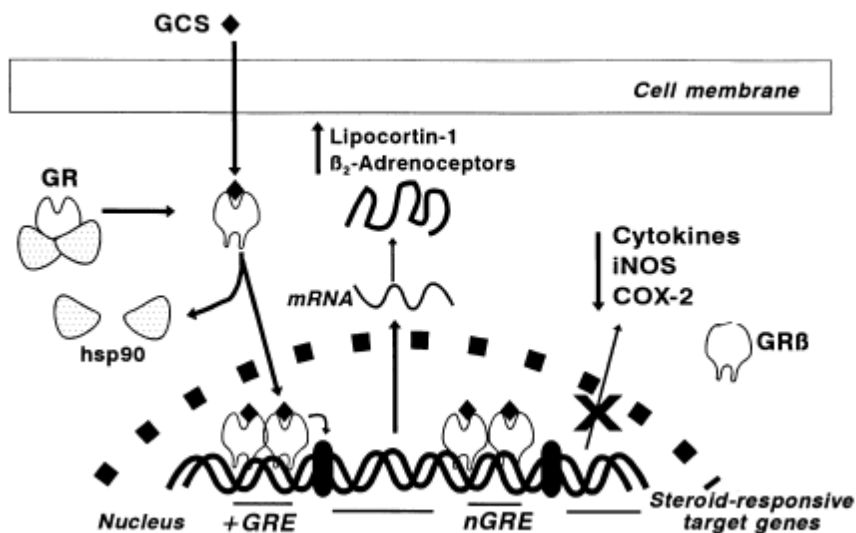
inflammatoire et que se traduit cliniquement par des effets analgésiques, antipyrétiques, anti-oedémateux, vasoconstricteur et anti-migratoire (Dussauze et *al.*, 2007; Tréchet and Jouzeau, 2014). Donc, leur administration lors du processus inflammatoire est un traitement symptomatique et non étiologique.

Il existe plusieurs anti-inflammatoires de synthèse, stéroïdiens (AIS) et non stéroïdiens (AINS), mais ils présentent plusieurs effets secondaires indésirables. En plus, il existe des médicaments à base de biomolécules qui sont moins toxiques auxquels les microorganismes sont moins résistants (Farahpour and Habibi, 2008; Bernstein et *al.*, 2018).

### II.5.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes sont des analogues structuraux d'hormones corticosurrénales (cortisone et cortisol) qui agissent essentiellement au niveau transrationnel après avoir être liés à des récepteurs spécifiques cytosoliques (Dejean and Richarda, 2013). Ils ont des propriétés anti-inflammatoires et antalgiques, mais également immuno-suppressives (Dangoumau, 2006). Ils inhibent les étapes précoces et tardives de la réaction inflammatoire et contrôlent ainsi les différents stades de l'inflammation (vasodilatation, œdème, migration et phagocytose). Une fois liés sur les récepteurs, le complexe glucocorticoïdes-récepteur va jouer le rôle d'un facteur de transcription et induit la synthèse protéique comme c'est le cas pour la lipocortine, inhibiteur de la phospholipase A2 (PLA2). Par inhibition des facteurs de transcription NF-kB et AP-1 (protéine activatrice-1), ce complexe diminue l'expression de plusieurs protéines pro-inflammatoires (**Figure 12**) comme les cytokines et les chimiokines (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-8, IL-12, GM-CSF, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ ), les molécules d'adhésion, le COX-2 et le NO-synthase (Devillier, 2005; Dussauze et *al.*, 2007). Comme ils amplifient la transcription des gènes codants pour d'autres cytokines anti-inflammatoires lymphocytaires, tel que l'IL-10 et le TGF $\beta$ . Les glucocorticoïdes suppriment également la libération des prostaglandines, des leucotriènes et du NO. De plus, ils inhibent l'expression des molécules d'adhésion, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T par des mécanismes multiples (Cruz-Topete and Cidlowski, 2015). A l'échelle cellulaire, ces molécules inhibent la maturation des monocytes en macrophages et diminuent leur migration vers le site de l'inflammation. Ils inhibent également l'activation et la migration des PMNs et la dégranulation des mastocytes et des polynucléaires éosinophiles (Dussauze et *al.*, 2007). Malheureusement, le traitement prolongé par ces médicaments est associé à de nombreux effets indésirables. Ils réduisent les défenses de l'organisme et provoque des perturbations métaboliques et endocriniennes qui peuvent être aiguës (hypertension artérielle, dérégulation

de la synthèse naturelle de glucocorticoïdes, ulcère gastroduodéal...etc.) ou chroniques tel que l'ostéoporose, les cataractes et la prise de poids (Strehl *et al.*, 2011; Cruz-Topete and Cidlowski, 2015).



**Figure 12.** Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (Barnes, 1998).

### II.5.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) représentent un groupe de composés pharmacologiques qui ont tous des caractéristiques communes: effets anti-inflammatoire, antipyrétique, antalgique et anticoagulant (Lévy *et al.*, 2005). Ces propriétés résultent de l'inhibition des COX-1 et COX-2 qui entraîne une diminution des prostaglandines. La COX-1 est une enzyme constitutive présente dans la plupart des tissus et intervient dans la protection de la muqueuse gastrique, l'agrégation plaquettaire, l'homéostasie vasculaire et l'hémodynamique rénale (Corrado *et al.*, 2009; Brandstätter *et al.*, 2010; Tréchet and Jouzeau, 2014). La COX-2 est spécifiquement produite au niveau du site inflammatoire sous la stimulation du TNF $\alpha$  et d'interleukine 1 et c'est elle qui est impliquée dans les phénomènes liés à l'inflammation et dans quelques processus associés à la prolifération cellulaire et est responsable des effets pharmacodynamiques des AINS (Brandstätter *et al.*, 2010). Les AINS classiques ne sont pas spécialisés dans leur action et affectent à la fois la COX-1 et COX-2. Les effets secondaires des anti-inflammatoires non stéroïdiens sont dus à l'inhibition de la COX-1 et donc l'inhibition de la production de prostaglandines. Ces effets indésirables sont principalement digestifs (ulcères gastroduodéaux) et à un moindre degré rénal (Brandstätter *et al.*, 2010; Lahmidani *et al.*, 2012). L'apparition de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens sélectifs des COX-2 appelés Coxibs qui n'affectent que l'excès de prostaglandines produites au cours de l'inflammation vient réduire les effets secondaires des AINS, mais,

malheureusement, ce médicament a des effets néfastes notamment cardiovasculaires (Brandstätter et *al.*, 2010; Tréchet and Jouzeau, 2014).

### II.5.3. Anti-inflammatoires naturels

Pour réduire les effets indésirables des anti-inflammatoires commercialisés, le recours aux ressources naturelles, plus particulièrement les plantes médicinales, s'impose comme une piste très importante à explorer afin de découvrir des médicaments efficaces et à moindre effets secondaires.

Les plantes médicinales sont largement utilisées en médecine traditionnelle dans le monde entier depuis des milliers d'années soit comme additifs alimentaires ou comme substances thérapeutiques, et cela pour soulager de nombreuses maladies telles que l'arthrite, l'asthme, l'eczéma, la goutte, la rhinite allergique et les ulcères gastriques ou duodénaux (Wiart, 2006). Ces propriétés anti-inflammatoires des plantes médicinales sont dues à leur teneur en métabolites secondaires bioactives comme les polyphénols et spécialement les flavonoïdes, les terpènes, les alcaloïdes, les stérols, les caroténoïdes, les vitamines (A, E et C), les huiles essentielles et les polysaccharides (Setty and sigal, 2005; Iwalewa et *al.*, 2007; Rathee et *al.*, 2009). L'activité anti-inflammatoire des composés phénoliques a été démontrée dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. Ces molécules peuvent agir à différents niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant les enzymes pro-inflammatoires telle que la PLA2, les COX et LOX (Middleton et *al.*, 2000; Cho et *al.*, 2003; Iwalewa et *al.*, 2007), les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires comme les tyrosines et les serines-thréonine kinases, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion, l'activation du facteur nucléaire kappa-B qui induit l'expression de plusieurs gènes inflammatoires (Iwalewa et *al.*, 2007) et la production des espèces réactives de l'oxygène (Duwiejua et *al.*, 1993). En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables de réduire les dommages tissulaires causés par les ROS et limiter donc les conséquences de différentes maladies inflammatoires. L'activité anti-oxydante des flavonoïdes est due principalement à leurs capacités de piéger les radicaux libres, de chélater les métaux et de neutraliser l'oxygène singlet (Shahidi and Ambigaipalan, 2015). Ces molécules sont également capables de stimuler la production des molécules antioxydantes endogènes en activant la voie de Nrf-2/HO-1 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 Heme oxygenase-1), (Shi et *al.*, 2013).

Certains flavonoïdes peuvent inhiber la dégranulation des leucocytes sans modifier la production de radicaux superoxydes. L'effet inhibiteur de certains flavonoïdes sur la

dégranulation des mastocytes est dû à une modification de récepteur associé aux canaux de calcium au niveau de la membrane plasmique (Nijveldt et al., 2001).

Plusieurs flavonoïdes régulent l'activité des enzymes impliquées dans les différentes voies métaboliques de l'acide arachidonique (COX, LOX, la phospholipase A2 et l'iNOS). Cela induit une diminution du taux d'acide arachidonique, des leucotriènes, du monoxyde d'azote et des prostaglandines, qui sont tous des médiateurs inflammatoires (Durga et al., 2014).

Les flavonoïdes régulent l'activité des protéines kinases C (PKC) et des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) en limitant ainsi la liaison des facteurs de transcription à l'ADN telles que la protéine activatrice-1 (AP-1) et le facteur nucléaire kB (NF-kB), (Kim et al., 2004). La quercétine et la lutéoline inhibent la voie de p38 et de 2 ERK 1/2, qui sont des principales enzymes des MAPK, produisant ainsi le TNF $\alpha$  (Durga et al., 2014).

Les acides phénoliques, les anthocyanes et les tanins interviennent dans l'atténuation de l'inflammation en inhibant l'activité de certaines enzymes pro-inflammatoires et en bloquant la production de certains médiateurs de l'inflammation comme le NO et les cytokines pro-inflammatoire (Búfalo et al., 2013; Zhang et al., 2014).

Les terpènes, les alcaloïdes, les stérols et les huiles essentielles montrent également des propriétés anti-inflammatoires (Ocaña-Fuentes et al., 2010; Bernstein et al., 2018). Ils peuvent agir sur plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire, en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique, les voies de la transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion, l'activation de NF- $\kappa$ B et la génération des ROS (Iwalewa et al., 2007; Tangney and Rasmussen, 2013).

Les tannins possèdent également des propriétés anti-inflammatoires, Ils inhibent l'expression de médiateurs inflammatoires, tels que certaines cytokines, l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et la COX-2 (Mohammed et al., 2014).

## **II.6. Relation stress oxydant et inflammation**

Au cours de l'inflammation, les cellules inflammatoires augmentent leur consommation en oxygène et produisent des quantités importantes d'espèces réactives de l'oxygène et de nitrogène. La production de ces molécules s'effectue normalement dans les phagosomes en contact direct avec les agents pathogènes ce qui permet leur neutralisation. Cependant, dans certains cas, les ROS peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire et peuvent déclencher

des réactions d'oxydation toxiques, conduisant à des lésions tissulaires caractéristiques des maladies inflammatoires (Hurtado-Nedelec et *al.*, 2014; Majdalawieh and Fayyad, 2015; Sánchez et *al.*, 2015). Ces cellules inflammatoires produisent les ROS via le système NADPH-oxydase, enzyme membranaire capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire des anions superoxydes ( $O_2^-$ ) qui, rapidement se transforment par dismutation en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ce dernier peut diffuser dans le milieu extracellulaire, où il est impliqué dans une cascade de réactions chimiques conduisant à la formation d'autres espèces oxygénées plus puissantes et à une demi-vie plus longue telles que l'oxygène singlet ( $^1O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) (Henrotin et *al.*, 2001; Barton, 2008; Hurtado-Nedelec et *al.*, 2014). L'inflammation accélère la production d'espèces oxygénées et diminue la capacité de défense antioxydante, favorisant l'apparition d'un stress oxydant, un facteur important dans le développement des maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et cancer (Auddy et *al.*, 2003; Koechlin-Ramonatxo, 2006). Ainsi, le stress oxydant peut produire ou entretenir un processus inflammatoire, il inactive les antiprotéases, et à l'inverse active les métalloprotéases, favorisant une protéolyse et une destruction cellulaire non contrôlée. De plus, l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B stimule la transcription des facteurs pro-inflammatoires, à l'origine de la libération de nombreux médiateurs de l'inflammation (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les ROS modulent la production des cytokines pro-inflammatoires et d'autres médiateurs inflammatoires en activant des facteurs de transcription intracellulaires tel que le NF- $\kappa$ B, ainsi que la phosphorylation de différentes tyrosines kinases (Sánchez et *al.*, 2015).

Différents signaux extracellulaires, tels que le stress oxydatif, les cytokines ou les antigènes bactériens et viraux peuvent activer la kinase de l'inhibiteur  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) entraînant ainsi sa phosphorylation et ensuite sa dégradation. Cela a pour conséquence, l'activation de NF- $\kappa$ B qui sera transloqué vers le noyau où il induit la transcription d'un grand nombre de gènes pro-inflammatoires, y compris ceux qui codent pour les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1), les chimiokines, les molécules d'adhésion et les enzymes inflammatoires comme l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), la COX-2 et la lipoxigénase (LOX)-5 (Morgan and Liu, 2011; Sánchez et *al.*, 2015).

### III. ARBUTUS UNEDO L.

*Arbutus unedo* L. est un arbuste à feuilles persistantes de la famille des Ericaceae, très répandu en Algérie. Il est communément appelé arbre aux fraises, arbousier ou fraisier

(Morgado et *al.*, 2018), localement, il est appelé sasnou ou encore lendj. Cette plante est originaire de la région méditerranéenne et d'Afrique du Nord, mais elle se trouve aussi dans d'autres régions caractérisées par des étés chauds et des hivers doux et pluvieux (El Haouari et *al.*, 2007).

### III.1. Classification botanique d'*Arbutus unedo* (Cavin A., 1999)

Embranchement : Spermatophytes

Sous-embranchement : Eudicots

Classe : Magnoliopsidées

Sous-classe : Astéridées

Ordre : Ericales

Famille : Ericacées

Genre : *Arbutus*

Espèce : *Arbutus unedo* L.

### III.2. Aspect botanique d'*Arbutus unedo*

*Arbutus unedo* L. est un arbuste à feuilles persistantes, généralement de 1,5 m à 3m de haut (**Figure 13**). Les arbustes montrent une grande résistance aux conditions environnementales difficiles comme la sécheresse, le froid et les sols lourds ou pauvres (Gomes and Canhoto, 2009). Ils régénèrent rapidement après les feux de forêts (Arnan et *al.*, 2013). La résistance d'*A. unedo* aux conditions environnementales difficiles joue un rôle central en ce qui concerne la diversité de la faune et la prévention contre l'érosion des sols (Morgado et *al.*, 2018).

Le tronc et les branches sont robustes et présentent une écorce brun-rougeâtre se détachant en lanières fibreuses sur les spécimens âgés. Les feuilles elliptiques de 5 à 10 cm, sont alternées, simples, d'un vert foncé luisant au-dessus et vert pâle au-dessous, en cuir et ont une marge dentelée, avec un pétiole d'environ 10 mm (Gomes, 2011; Maleš et *al.*, 2013). Les fleurs, avec des lobes recourbés, sont en forme de cloches, de 8-9 mm de long, de couleur blanchâtre et souvent rose pâle (Maleš et *al.*, 2013). Elles sont rassemblées en grappes rameuses et terminales, hermaphrodites, régulières et possédant 10 étamines. Le calice gamosépale possède 5 lobes courts. La corolle gamopétale de 5 à 7 mm de longueur forme un petit grelot de couleur blanchâtre qui devient caduque avant la fanaison de la fleur. Chaque extrémité des 5 pétales soudés se termine par une courte dent enroulée en dehors (Gomes, 2011).

Les fruits sont des baies globulaires de 2 cm de diamètre, recouverts de papilles coniques, d'une couleur qui passe du vert au jaune puis au rouge orangé à l'état de maturation (Sánchez-Moreno, 2002 ; Oliveira et *al.*, 2011). Ils prennent environ 12 mois pour mûrir ; c'est la raison pour laquelle l'arbuste porte des fruits et des fleurs matures en même temps. Le processus de floraison et de fructification s'étend d'Octobre à Février (Mhamdi Takrouni et *al.*, 2012).



**Figure 13.** Photographie d'*Arbutus unedo* L.

### III.3. Composition chimique

Plusieurs études phytochimiques ont montré que *A. unedo* contient une amalgame de métabolites secondaires dans les diverses parties de la plante. Selon Carcache-Blanco et ses collaborateurs (2006), *A. unedo* renferme plusieurs groupes de molécules actifs dont des acides aromatiques, des iridoïdes, des monoterpénoïdes, des phénylpropanoïdes, des stérols, des triterpénoïdes et des flavonoïdes. La fraction phénolique des feuilles contient une grande diversité des composés à savoir les tanins, les flavonoïdes dont gallate de catéchine,

myricétine, rutine, afzéline, juglanine et avicularine (Legssyer et *al.*, 2004). D'après Fiorentino et ses collaborateurs (2007), l'arbutine, la catéchine et le gallate d'éthyle sont les principaux composés polyphénoliques présents dans les feuilles d'*A. unedo*. La quercitrine, l'isoquercitrine, l'hyperoside et la rutine sont les flavonoïdes majeurs identifiés dans les feuilles de cette plante (Males et *al.*, 2006). D'autres flavonoïdes comme l'anthocyanine, proanthocyanine, delphinidine-galactoside, les flavonols quercétine et kaempférol ont été trouvés dans les fruits (Oliveira et *al.*, 2011). Les fruits sont riches aussi en différents types de glucides (Özcan and Haciseferogullan, 2007), en protéines (Özcan and Haciseferogullan, 2007 ; Barros et *al.*, 2010) et en acides gras dont l'acide  $\alpha$ -linoléique, l'acide oléique et l'acide linoléique (Oliveira et *al.*, 2011).

### III.4. Activités biologiques

Les métabolites secondaires d'*A. unedo* lui ont conféré diverses propriétés biologiques et pharmacologiques. Il a été montré par plusieurs études que les extraits de différentes parties d'*A. unedo* ont une activité antibactérienne, antifongique et antiparasitaire (Kivçak et *al.*, 2009 ; Dib et *al.*, 2010 ; Orak et *al.*, 2011 ; El ouarti et *al.*, 2012 ; Dib et *al.*, 2013). Les activités antimicrobiennes ont été attribuées aux tanins, flavonoïdes et des composés phénoliques (Djipa et *al.*, 2000 ; Esquenazi et *al.*, 2002).

Il a été montré que les tanins isolés de l'extrait méthanolique des feuilles d'*A. unedo* ont un fort effet antiplaquettaire (Mekhfi et *al.*, 2006). D'autre part, l'effet antiagrégant des racines d'*A. unedo* a été attribué en partie aux composés polyphénoliques présents dans leurs extraits (Mekhfi et *al.*, 2004). Des études sur des extraits aqueux des racines d'*A. unedo* ont montré un effet antidiabétique qui pourrait être dû à l'amélioration de l'absorption cellulaire du glucose d'une part et à l'amélioration de l'activité de l'insuline ou à la diminution de l'absorption jéjunal du glucose d'autre part (Bnouham et *al.*, 2007, Bnouham et *al.*, 2010).

L'effet antihypertenseur d'*A. unedo* a été démontré par plusieurs études (Ziyyat and Boussairi, 1998 ; Ziyyat et *al.*, 2002 ; Legssyer et *al.*, 2004 ; Afkir et *al.*, 2008). Afkir et ses collaborateurs (2008), ont trouvé que l'extrait aqueux des racines d'*A. unedo* régresse le développement de l'hypertension et empêche l'hypertrophie du myocarde. De plus, les extraits des racines et des feuilles de cette plante ont également amélioré la sensibilité du barorécepteur artériel contrôlant la fréquence cardiaque à une pression artérielle aigue (Afkir et *al.*, 2008). D'autres études ont montré que les extraits aqueux des feuilles et des racines d'*A. unedo* provoquent une relaxation de l'endothélium des anneaux aortiques des rats



prétraités avec noradrénaline (Ziyyat et *al.*, 2002 ; Legssyer et *al.*, 2004). Cet effet vaso-relaxant a été attribuée au composés polyphénoliques, principalement des tanins oligomères condensés et du gallate de catéchine (Legssyer et *al.*, 2004).

Une étude portant sur des extraits aqueux et méthanolique des feuilles d'*A. undedo* a montré un pouvoir anti-inflammatoire qui a été attribué à la réduction de la production de l'interleukine (IL)-6 et d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et IL-1, à la diminution du recrutement des neutrophiles et à la diminution de l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et l'activité de la COX-2 (Mariotto et *al.*, 2008a). Une autre étude a attribué l'activité anti-inflammatoire d'*Arbutus unedo* à leur effet inhibiteur de l'activité de STAT1 et ceci par l'activation de la protéine tyrosine phosphatase SHP2 (Mariotto et *al.*, 2008b).

De nombreuses études ont démontré la puissante activité antioxydante des extraits des différentes parties d'*A. unedo* notamment des feuilles et des fruits (Aruoma, 1996 ; Andrade et *al.*, 2009 ; Mendes et *al.*, 2011).

L'effet anti-tumoral d'*Arbutus unedo* a été démontré par Afrin et *al.* (2017), qui ont trouvé que le miel d'*A. unedo* est doté d'un effet chimio-protecteur qui est à l'origine de l'inhibition de la prolifération cellulaire et la diminution de la viabilité cellulaire dans le cancer du colon. De même, Guimarães et ses collaborateurs (2014) ont noté que l'extrait méthanolique des fruits d'*A. unedo* inhibe la croissance de la tumeur à travers l'inhibition de la prolifération cellulaire des différentes lignées de cellules cancéreuses. Par contre, d'autres études ont attribué la protection contre la progression tumorale à l'inhibition de la COX-2 (Chang et *al.*, 2000 ; Cuendet and Pezzuto, 2000).

### III.5. Usage traditionnel

*Arbutus unedo* est une plante fréquemment utilisée en médecine traditionnelle comme remède naturel contre le diabète et l'hypertension artérielle (Ziyyat et *al.*, 1997 ; Bnouham et *al.*, 2002). Elle est connue aussi pour ses vertus diurétique (González et *al.*, 2010). Toutes les parties d'*A. unedo* (les feuilles, les fruits, les écorces et même les racines) sont utilisées pour les maladies rénales (El-Hilaly et *al.*, 2003), dermatologiques, urologiques (Leonti et *al.*, 2009), cardiaques (Jouad et *al.*, 2001) et gastro-intestinales (Leonti et *al.*, 2009). Des propriétés anti-hémorroïdaires et antidiarrhéique sont attribuées aussi aux feuilles de cette plante (Ziyyat et *al.*, 1997 ; Cornara et *al.*, 2009). De même, les racines de cette plante sont utilisées en cas de douleurs abdominales, d'affections de la vessie (Novais et *al.*, 2004) et

d'infections vaginales (Verde et *al.*, 2006). En Turquie, les tisanes préparées à partir de feuilles de cette plante sont utilisées comme diurétique (Çubukçu and Suzgeç 1997).

Dans le bassin méditerranéen, les fruits charnus comestibles d'*A. unedo* sont principalement consommés sous forme de produits transformés comme les confitures, les marmelades, les gelées et les boissons alcoolisées telles que le cidre, mais ils peuvent être une bonne source de la vitamine C et des fibres alimentaires s'ils sont consommés sous forme de fruits frais (Pallauf et *al.*, 2008 ; Ruiz-Rodríguez et *al.*, 2011).

L'*A. unedo* est traditionnellement désignée comme une plante mellifère (Guzman Tirado, 1997), et le miel d'arbousier est très apprécié pour son goût amer et ses propriétés biologiques, sans oublier son importance économique remarquable (Tuberoso et *al.*, 2013 ; Tuberoso et *al.*, 2010).

# PARTIE EXPÉRIMENTALE

# MATERIEL & METHODES

## **MATERIEL ET METHODES**

### **I. Matériel**

#### **I.1. Matériel végétal**

La plante *Arbutus unedo* L. a été récoltée en juin 2017 de la région de djebel Babour, au nord de la wilaya de Sétif. L'espèce a été identifiée par le professeur Laouar Hocine (Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Sétif 1, Algérie). La partie aérienne de la plante collectée a été nettoyée puis séchée à température ambiante et à l'ombre. Ensuite, les feuilles ont été séparées puis finement broyées et conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à leur utilisation.

#### **I.2. Animaux**

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris *Swiss albinos*, mâles et femelles pesant entre 25 et 30g, procurés aux près de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux repartis en groupes comportant 10 souris ont été hébergés dans des cages en polypropylène à température ambiante et à cycle naturel de la lumière, avec accès libre à l'eau et à l'alimentation. Les aliments ont été procurés de l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) d'El-Ksar - Bejaia. Après une période d'adaptation de 7 jours, les animaux ont été pesés, marqués, et soumis à jeun pendant une nuit avant leur utilisation.

#### **I.3. Sang humain et bovin**

Le sang humain frais a été obtenu par prélèvement à partir de donneurs volontaires sains et non fumeurs et qui n'ont pas pris de traitement médical pendant au moins quinze jours. Le sang bovin est procuré de l'abattoir de la ville de Sétif.

## **II. Méthodes**

### **II.1. Préparation des extraits**

L'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et l'extrait butanolique (E.But) sont préparés comme décrits par Akkal et *al.* (2010). Une pesée de 100 g des feuilles d'*Arbutus unedo* broyées est mise en macération trois fois dans du méthanol 70%. Puis, le macéra est filtré et le méthanol est évaporé sous pression réduite à 40°C dans un rotavapeur (BÜCHI R-210). La solution obtenue est séchée avant d'être dissolue dans de l'eau bouillante puis refroidi 24h à température ambiante. Après filtration, la solution aqueuse obtenue est soumise à un fractionnement par l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol successivement. Ensuite, les solvants sont

évaporés et les solutions obtenues sont séchées et les deux extraits obtenus sont conservés à -32°C jusqu'à leur utilisation.

## II.2. Analyses phytochimiques

### II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur totale en composés phénoliques solubles des deux extraits d'*A. unedo* est estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li et al., 2007) qui se base sur la réduction en milieu alcalin d'un mélange de phosphotungestique ( $WO_4^{2-}$ ) phosphomolybdique ( $MoO_4^{2-}$ ) du réactif de Folin par les groupements oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Brièvement, un volume de 100  $\mu$ l de différentes concentrations de chaque extrait ou de l'acide gallique est mélangé à 500  $\mu$ l du réactif du Folin-Ciocalteu dilué à 10% dans de l'eau distillée. Après 4min, 400  $\mu$ l de carbonate de sodium (7.5% dans de l'eau distillée) sont additionnés. L'absorbance est mesurée à 765nm après 90min d'incubation contre un blanc dépourvu de l'échantillon à tester qui a été remplacé par le solvant. La concentration en polyphénols dans chaque extrait est exprimée en  $\mu$ g d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait ( $\mu$ g EAG/mg d'extrait), et calculée à partir de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique (20 à 200  $\mu$ g/ml), (**Figure 14**).

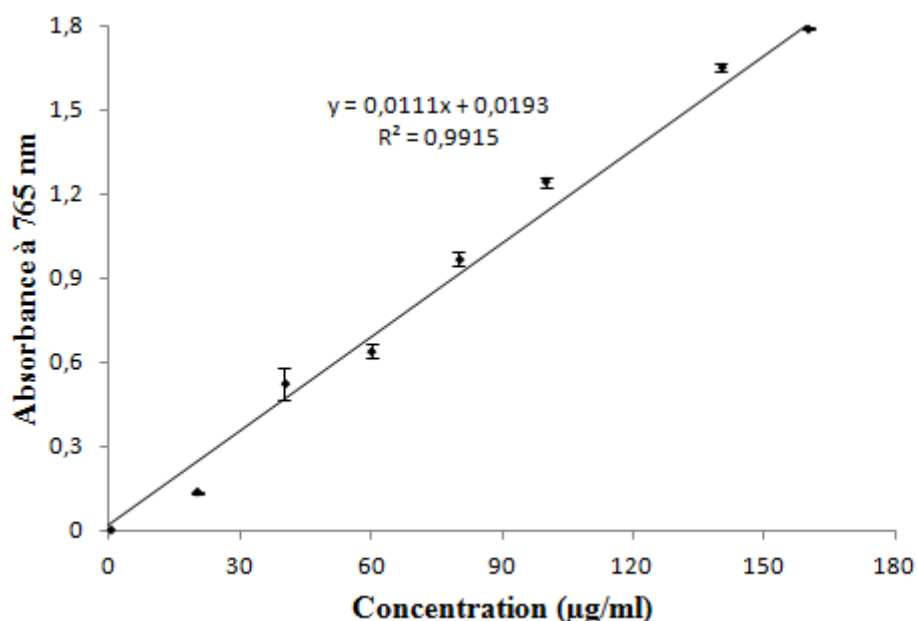


Figure 14. Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

### II.2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes des extraits d'*A. unedo* a été réalisé selon la méthode du trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) décrite par Bahorun et *al.* (1996) qui se base sur les propriétés chélatrices de l'ion aluminium. Brièvement, 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de l'extrait à différentes concentrations préparées dans le méthanol. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits est déduite à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec de la quercétine (**Figure 15**), et est exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalents de quercétine par mg d'extrait ( $\mu\text{g EQ}/\text{mg}$  d'extrait).

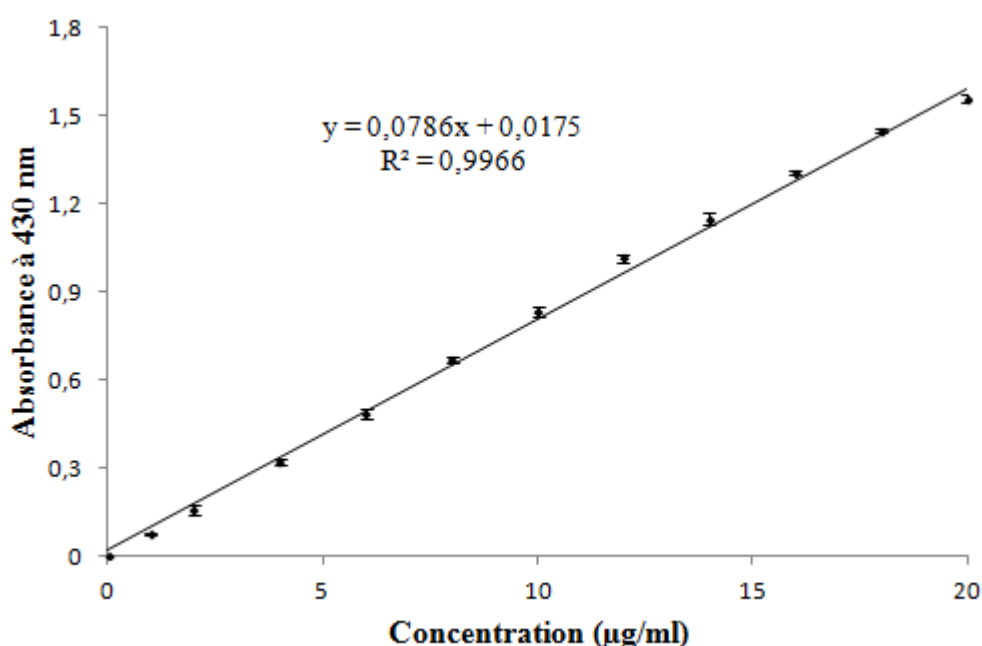


Figure 15. Droite d'étalonnage de la quercétine.

### II.2.3. Détermination des composés phénoliques par LC-ESI/MS

L'étude phytochimique des extraits d'*Arbutus unedo* a été réalisée par chromatographie liquide sur colonne à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI/MS) selon la méthode décrite par Sulaiman et ses collaborateurs (2014) en utilisant un système HPLC Agilent Technology (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA), 1200 Infinity, couplé à un détecteur LC/MS, API-3200 et une colonne ZORBAX SB-C18 ( $4.6 \times 150$  mm,  $3.5 \mu\text{m}$ ).

Les deux extraits (200 ppm) sont dissouts dans le méthanol à température ambiante, puis filtrés à travers une membrane de téflon PTFE (Polytétrafluoroéthène ;  $0.45 \mu\text{m}$ ) à l'aide d'un

injecteur pour éliminer toutes les particules. Le volume d'injection est de 20 µl. La phase mobile est constituée d'un mélange de deux solutions: 0.1% d'acide formique préparé dans l'eau distillée ultra pure (A) et l'acetonitrile (B). Le débit est de 1 ml/min à 35°C et le gradient est comme suit : 0-3 min (10% B), 4-8 min (10% B), 9-11 min (80% B), 12-13 min (80 % B) et 14-15 min (10% B). Le mode d'ionisation de l'instrument LC-ESI/MS est négatif, opérant avec le gaz de nitrogène à une température de 650°C et un débit de 4.0 L/min, un électronébuliseur de 50 psi (3.45 bars), un voltage capillaire de 4500 V et un voltage de fragmentation de 70 V et une énergie de collision de 35 eV. La détection a été effectuée par un détecteur UV-Vis à 280 nm. Le contrôle du spectromètre de masse ainsi que l'analyse des données ont été effectués par le logiciel Analyst® version 1.6.3.

### **II.3. Etude de la toxicité aigue**

La toxicité aigue des extraits d'*Arbutus unedo* a été évaluée suivant les lignes directrices pour les essais des produits chimiques de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE 425, 2008) chez des souris *Swiss albinos* femelles de 28 à 34g préalablement mises à jeun pendant 16 h. Les souris ont été répartis en groupe de 5 et reçoivent par voie orale 10 ml/Kg de chaque extrait à la dose 2 g/kg de poids corporel. Les souris témoins ont reçu un même volume d'eau physiologique. Ensuite et afin d'apprécier les changements comportementales et les symptômes de toxicité des animaux en comparaison avec le groupe non traité, (mort, agitation, respiration, asthénie, convulsions, anorexie, paralysie partielle, diarrhée), une bonne observation individuelle des souris a été effectuée durant les quatre premières heures après le traitement puis quotidiennement pendant 14 jours, et cela pour permettre d'enregistrer les effets tardifs y compris le nombre de mortalité. Afin de suivre l'évolution corporelle des souris le long de l'expérimentation, leur poids est déterminé avant, une semaine et deux semaines après le traitement.

### **II.4. Activité antioxydante *in vivo* des extraits d'*Arbutus unedo***

L'activité antioxydante *in vivo* des extraits d'*A. unedo* est évaluée selon le protocole décrit par Zhang et ses collaborateurs (2003). Pratiquement, des souris mâles, *Swiss albinos*, adultes, de poids de 25 à 30g, sont répartis selon l'homogénéité de leurs poids en huit lots de 10 animaux chacun. Durant trois semaines, les souris reçoivent quotidiennement et par voie orale 75, 150 ou 300 mg/kg d'E.AE ou d'E.But. Une dose de 150 mg/kg d'acide ascorbique est administrée au groupe du contrôle positif. Les souris du groupe contrôle négatif ont reçu le même volume d'une solution saline normale (0.9%). Les animaux sont maintenus à température ambiante avec accès libre à l'eau et à la nourriture. Les souris sont sacrifiées 24 h



après l'administration de la dernière dose. Après dissection, le foie de chaque souris est immédiatement récupéré, nettoyé avec de l'eau physiologique stérile et froide. Ensuite, un poids de 500 mg de chaque organe est broyé avec 5 ml de tampon phosphate froid ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH 7.4) à l'aide d'un Broyeur IKA-RW15. L'homogénat obtenu est centrifugé à 4000 rpm pendant 20 min à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est aliquoté dans des eppendorfs puis conservé à -32°C jusqu'à son utilisation pour le dosage des marqueurs antioxydants tissulaires.

#### **II.4.1. Activité catalase**

L'activité de la catalase est déterminée selon le protocole décrit par Aebi et ses collaborateurs (1984), dont le principe est basé sur la diminution de l'absorbance à 240 nm qui est due à la décomposition du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en présence de la catalase. Pratiquement, 34  $\mu\text{l}$  de surnageant dilué au 1/10 est ajouté directement dans la cuvette contenant 966  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 19.5 mM préparé dans le tampon phosphate de sodium (50 mM, pH=7). La lecture est faite contre un blanc contenant le surnageant de foie et le tampon phosphate de sodium uniquement en utilisant un spectrophotomètre UV/VIS (SPECORD 210 PLUS). L'activité de la catalase est exprimée en  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  décomposé/min/mg de protéines.

#### **II.4.2. Activité SOD**

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) est mesurée par la méthode décrite par Marklund (1974) et qui se base sur la compétition entre la réaction d'auto-oxydation du pyrogallol par les radicaux  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et la dismutation de ces radicaux par la SOD. Pratiquement, 25  $\mu\text{l}$  de la SOD (36 - 357 ng/ml) ou du surnageant de l'homogénat sont mélangés avec 935  $\mu\text{l}$  de tampon constitué de 50 mM Tris et de 1 mM d'acide diéthylènetriaminépentacétique (DTPA), le pH du tampon est amené entre 8.6 et 8.7 avec l'acide cacodylique (50mM). Ce pH induit une variation de l'absorbance du pyrogallol comprise entre 0.030-0.031/min. Après homogénéisation, 40  $\mu\text{l}$  de pyrogallol (10 mM préparé dans du HCl 0.01N) sont ajoutés et le milieu réactionnel est bien homogénéisé de nouveau. L'enregistrement de l'absorbance est lancé 45 secondes après l'addition du pyrogallol à 420 nm pendant 1 minute. L'activité de la SOD est exprimée en unité par milligramme de protéine où l'unité est calculée comme suit :

$$U = (\text{pourcentage d'inhibition}/50) \times \text{le facteur de dilution}$$

Le pourcentage d'inhibition de l'auto-oxydation du pyrogallol est calculé selon la formule suivante :

% Inhibition= Absorbance contrôle-Absorbance échantillon/Absorbance contrôle.

L'absorbance du contrôle correspond à l'absorbance du pyrogallol seul sans échantillon qui a été remplacée par le tampon (absorbance maximale).

L'absorbance de l'échantillon correspond à l'absorbance du pyrogallol en présence de la SOD ou du surnageant.

#### **II.4.3. Dosage du MDA**

La peroxydation lipidique qui constitue le marqueur majeur du stress oxydant est évaluée par dosage du malondialdéhyde (MDA), un des produits terminaux formés lors de la peroxydation des acides gras polyinsaturés méditée par les radicaux libres, selon le protocole de Mihara et Uchiyama (1978). Pratiquement, 125 µl de surnageant de foie est ajouté à 125 µl de TCA (20%) et 250 µl de TBA (0.67%) et le mélange réactionnel est chauffé à 100°C pendant 15 min. Après un refroidissement rapide, 1 ml de n-butanol est ajouté et le milieu réactionnel est vigoureusement agité puis centrifugé pendant 15 min à 3000 rpm. L'absorbance du surnageant est lue à 530 nm contre un blanc contenant de l'eau distillée à la place du surnageant. La concentration en MDA en nM est calculée en utilisant le coefficient d'extinction du complexe MDA - TBA ( $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) à 532 nm.

#### **II.4.4. Dosage du glutathion réduit**

Le dosage de glutathion réduit (GSH) est réalisé selon la méthode d'Ellman (1959) qui consiste en l'évaluation de la réduction du réactif d'Ellman DTNB (5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)) par les groupements thiols du glutathion en formant l'acide 2-nitro-5-mercaptobenzoïque. Ce produit est caractérisé par une coloration jaune intense quantifiable par spectrophotométrie à 412 nm. Pratiquement, 200 µl de TCA à 10% sont mélangés à 200 µl d'homogénat et laissés reposer pendant 5 minutes. Ensuite, le mélange est centrifugé 10 minutes à 2000 t/min. Un volume de 200 µl du surnageant obtenu est additionné à 1.8 ml de DTNB (0.6mM) et la lecture se fait après 5 minutes d'incubation à 412 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions. La concentration du glutathion réduit est exprimée en µmoles par milligramme de tissu.

#### **II.4.5. Dosage des protéines tissulaires**

Le taux des protéines tissulaires dans les homogénats est dosé suivant le protocole de Gornall et *al.* (1949) en utilisant le réactif de Biuret. L'albumine de sérum bovin est utilisée comme référence. Brièvement, 1 ml de réactif de Biuret est mélangé à 25µl d'homogénat hépatique de chaque extrait (E.AE ou E.But) ou d'albumine sérique bovine. Après 10

minutes d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 540 nm et la concentration des protéines totales est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Protéines totales (mg/ml)} = (\text{Absorbance échantillon} / \text{Absorbance référence}) \times C$$

C : concentration de l'albumine sérique bovine (référence).

Les concentrations des protéines totales dans les homogénats sont utilisées pour calculer les activités des SOD et catalase et aussi pour le dosage du MDA et du GSH.

## **II.5. Activité antioxydante *in vitro* des extraits d'*Arbutus unedo***

### **II.5.1. Effet anti-hémolytique des érythrocytes**

L'activité anti-hémolytique des extraits est évaluée par le test de l'hémolyse induite par l'AAPH (2,2,-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) selon la méthode décrite par Bouhlali *et al.* (2016) et qui consiste à soumettre des hématies à une agression radicalaire par des radicaux libres peroxydes produits par la décomposition thermique de l'AAPH. Pour résister à cette agression, tous les systèmes de défense enzymatiques et chimiques des érythrocytes se mobilisent à des niveaux intra et extracellulaires afin de protéger leurs intégrité, jusqu'à ce que la membrane cellulaire éclate et l'hémoglobine est libérée. L'hémolyse est suivie par spectrophotométrie à 630 nm, elle permet de mesurer la variation de la turbidité du milieu réactionnel au cours du temps. L'ajout dans le milieu réactionnel d'extraits à activité antioxydante retarde l'apparition de cette hémolyse.

Pratiquement, du sang provenant de souris mâles est dilué à 1% dans du tampon PBS (tampon phosphate 10 mM, pH=7.4, 125 mM NaCl). Ensuite, 120 µl de cette solution sanguine, sont placés dans un puits de microplaque mélangée avec 60 µl de solution d'E.AE ou d'E.But à la concentration de 40, 20, 10 et 5µg/ml dans du PBS, puis soumis à l'action de 120 µl du radical AAPH (120 mM) en solution à 37°C. La cinétique de la disparition progressive des hématies est suivie par la lecture de l'absorbance à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques 96 puits (ELX 800 de Bio-TEK instruments). Le Trolox et le PBS sont utilisés comme contrôle positif et négatif respectivement. La résistance des érythrocytes à l'attaque radicalaire est exprimée par le temps nécessaire à la lyse de 50% de ces cellules (HT<sub>50</sub>), (Girard *et al.*, 2006).

### **II.5.2. Test de DPPH**

L'activité anti-radicalaire des extraits a été évaluée par le test au DPPH (Que *et al.*, 2006) qui est un radical libre stable caractérisé par une couleur violette en solution dans l'éthanol, et présente une forte absorbance à 517 nm. Dans ce test, les antioxydants ajoutés réduisent le

DPPH en un composé jaune dont l'intensité de la couleur est directement proportionnelle au nombre de protons captés et peut être suivie par la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel (Mosquera et *al.*, 2007).

Pratiquement, 2 ml d'extrait ou de l'antioxydant standard BHT à différentes concentrations sont ajoutés à 2 ml de la solution éthanolique du DPPH (0.1mM). Après 30 min. d'incubation à l'obscurité, la décoloration par rapport au contrôle contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm contre un blanc d'éthanol. L'activité anti-radicalaire est déterminée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac: absorbance du contrôle.

At: Absorbance du test.

La concentration ayant la capacité de piéger 50% du radical DPPH (IC<sub>50</sub>) est déterminée.

### **II.5.3. Effet piégeur du radical ABTS**

L'activité antiradicalaire des extraits étudiés vis-à-vis du radical ABTS (acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) a été mesurée suivant le protocole de Re et *al.* (1999). Une solution d'ABTS<sup>•+</sup> (7.4 mM) est préparée en mélangeant des volumes égaux d'ABTS et de persulfate de potassium (2.6 mM) et conservée pendant 16h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Cette solution est ensuite diluée avec de l'éthanol afin d'obtenir une absorbance de 0.7 à 734 nm. Un volume de 190 µl de cette solution est placé dans chaque puits de microplaque et mélangé avec 10 µl de solution d'extrait ou de BHT à différentes concentrations. Après une incubation de 6 min, l'absorbance est mesurée à 734nm par un lecteur de plaque 96 puits (ELX 800 de Bio-TEK instruments). L'activité anti-radicalaire est déterminée par rapport à un contrôle contenant du méthanol selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac: absorbance du contrôle.

At: Absorbance du test.

La concentration ayant la capacité de piéger 50% du radical ABTS (IC<sub>50</sub>) est déterminée.

### **II.5.4. Effet piégeur du radical hydroxyle**

Le radical hydroxyle est le radical libre le plus réactif et peut endommager différentes biomolécules.

L'activité antiradicalaire des extraits de la partie aérienne d'*A. unedo* vis-à-vis du radical hydroxyle a été évaluée en suivant la méthode décrite par Sudha et al. (2011). Pratiquement, 0.5 ml de FeSO<sub>4</sub> (1.5 mM) et 0.35 ml de peroxyde d'hydrogène (6 mM) sont mixés avec 0.1 ml d'extrait ou de vitamine C (utilisée comme référence) à différentes concentrations (100-1400 µg/ml). Ensuite, 0.15 ml de salicylate de sodium (20 mM) sont ajoutés et le mélange réactionnel est incubé pendant 20 min. à 37 °C. L'absorbance du complexe salicylate hydroxylé est mesurée à 562 nm et l'effet piègeur du radical hydroxyle est calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

**A<sub>0</sub>**: Absorbance du contrôle (sans extrait)

**A<sub>1</sub>**: Absorbance en présence de l'extrait

**A<sub>2</sub>**: Absorbance sans sodium salicylate

#### **II.5.5. Effet piègeur de l'anion superoxyde**

La capacité des extraits étudiés à piéger les radicaux anions superoxyde a été mesurée selon la méthode décrite par Ozsoy et al. (2008). Premièrement, des radicaux superoxydes sont générés dans un mélange contenant 500 µl de NBT (Nitroblue tetrazolium, 156 µM dans un tampon phosphate 0,1 M, pH=7,4), 500 µl NADH (Nicotinamide adenine dinucleotide reduced, 468 µM dans un tampon phosphate 0,1M, pH=7,4) et 50 µl de chaque extrait ou d'acide gallique (standard) à différentes concentrations (5-500 µg/ml). Ensuite, 50 µl de PMS (60 µM dans un tampon phosphate 0,1M, pH=7,4) sont additionnés au mélange afin d'initier la réaction. Après 5 min d'incubation à 25°C, l'absorbance est mesurée à 560 nm contre un blanc qui contient tout les réactifs sauf le PMS. L'absorbance du mélange réactionnel est inversement proportionnelle à l'activité de piégeage des anions superoxydes. L'activité de piégeage des anions superoxydes est calculée en utilisant l'équation suivante:

$$\text{Activité de piégeage des anions superoxyde (\%)} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100$$

**A<sub>c</sub>** : absorbance du contrôle

**A<sub>s</sub>** : absorbance en présence d'extraits ou de référence.

#### **II.5.6. Effet piègeur du peroxyde d'hydrogène**

La capacité des extraits d'*A. unedo* à piéger le peroxyde d'hydrogène est déterminé suivant le protocole décrit par Lee et ses collaborateurs (2014). Pour cela, 20 µl de chaque extrait ou d'acide ascorbique (standard) à différentes concentrations (10-200 µg/ml) ont été mélangés avec 100 µl du tampon phosphate (0.1 M, pH=5) et 20 µl de peroxyde d'hydrogène (10 mM) et incubés pendant 5 min à 37 °C. Ensuite, 30 µl d'ABTS (1.25 mM) et 30 µl de

peroxydase (1U/ml) sont ajoutés et le mélange réactionnel est incubé 10 min à 37°C. L'absorbance est mesurée à 405 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits (ELX 800 de Bio-TEK instruments). La capacité des extraits à piéger le peroxyde d'hydrogène est calculée selon l'équation suivante:

$$\text{Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène (\%)} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle

As : absorbance en présence d'extraits ou standard.

### **II.5.7. Blanchiment du $\beta$ -carotène**

La capacité des extraits d'*Arbutus unedo* de prévenir le blanchiment du  $\beta$ -carotène est déterminée selon le protocole décrit par Bougateg et ses collaborateurs (2009). Cette méthode est basée sur la capacité des extraits à inhiber la formation des hydroperoxydes diène conjugués durant l'oxydation de l'acide linoléique. Premièrement, une émulsion fraîche de  $\beta$ -carotène/acide linoléique est préparée tout en mélangeant 0,5 mg de  $\beta$ -carotène dissout dans 1 ml de chloroforme avec 25  $\mu$ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme sous pression réduite à 45°C au rotavapeur (BÜCHI R-210), 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés et le mélange obtenu est agité vigoureusement. Ensuite, 2,5 ml de cette émulsion sont additionnés à 0,5 ml des solutions d'extraits ou de BHT (antioxydant de référence) et le mélange réactionnel est incubé dans un bain-marie à 50°C pendant 2 heures. Le contrôle négatif contient 0,5 ml d'eau distillée à la place des extraits, et 0,5 ml de méthanol à la place de BHT.

L'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 470 nm juste après sa préparation ( $t = 0$  min) et à des intervalles de 20 min jusqu'à la fin de l'expérience ( $t = 120$  min). L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle négatif selon l'équation suivante:

$$\text{Activité antioxydante \%} = [1 - (At_0 - At_{120})_{\text{test}} / (At_0 - At_{120})_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$At_0$ : absorbance au temps  $t = 0$ .

$At_{120}$ : absorbance au temps  $t = 120$  min.

### **II.5.8. Peroxydation de l'acide linoléique**

L'activité antioxydante totale des extraits d'*Arbutus unedo* est déterminée selon la méthode de thiocyanate ferrique décrite par Gülçin et ses collaborateurs (2005). Pratiquement, une émulsion de l'acide linoléique est préparée en mélangeant 0,028 g d'acide linoléique, 0,028 g de Tween 20 et 10 ml de solution tampon phosphate (0,04 M, pH=7,0). Ensuite, 600

µl de cette émulsion est mélangé avec 600 µl de solutions d'extraits ou de l'antioxydant standard (BHT) à une concentration de 50µg/ml. Le contrôle négatif contient tous les réactifs sauf l'échantillon à tester qui est remplacé par la solution tampon. Après agitation, le mélange est incubé à 25°C à l'obscurité pendant 15 min. La lecture se fait à 500 nm contre un blanc d'éthanol, en mélangeant 20 µl de cette préparation avec 1ml d'éthanol, 20 µl KCN et 20 µl de FeCl<sub>2</sub>. Cette procédure est répétée chaque 24 heures pendant 96 heures. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante:

$$\% \text{ d'inhibition de peroxydation} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac: absorbance du contrôle.

At: absorbance du test.

### **II.5.9. Pouvoir réducteur**

Le pouvoir réducteur des extraits d'*Arbutus unedo* est déterminé suivant la méthode décrite par Rohit et *al.* (2012). Initialement, des solutions d'extraits et de l'antioxydant de référence (BHT) à différentes concentrations sont mélangées avec 2.5 ml du tampon phosphate (200 mM, pH=6.6) et 2.5 ml de ferricyanide de potassium [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] (1%). Le mélange est incubé 20 minutes à 50°C puis laissé refroidir avant d'ajouter 2.5 ml de TCA (10%) et 0.5 ml de FeCl<sub>3</sub> (0.1%) au milieu réactionnel et l'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc sans FeCl<sub>3</sub>. L'absorbance est directement proportionnelle au pouvoir réducteur. La valeur EC<sub>50</sub> (concentration effectrice) est calculée à partir de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

### **II.5.10. Test phosphomolybdate (PPM)**

Le test phosphomolybdate (PPM) comme décrit par Prieto et ses collaborateurs (1999) a été réalisé pour évaluer la capacité antioxydante totale des deux extraits étudiés d'*Arbutus unedo*. Brièvement, 100 µl de chaque extrait ou d'acide ascorbique (standard) sont mélangé à 900 µl d'une solution qui contient 0.6 M d'acide sulfurique, 28 mM sodium phosphate, et 4 mM de molybdate d'ammonium. Après une incubation de 90 min. à 95°C, les tubes sont laissé refroidir avant de lire l'absorbance à 695 nm contre un blanc qui contient du méthanol à la place de l'échantillon. La capacité antioxydante totale est exprimée en µg équivalent d'acide ascorbique par milligramme de matière sèche (µg AAE/mg MS).

## **II.6. Activité anti-inflammatoire**

### **II.6.1. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris**

L'effet anti-œdémateux des extraits d'*Arbutus unedo* a été évalué en utilisant l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton (Manga et *al.*, 2004). Pratiquement, les souris reçoivent

sur la face interne de leurs oreilles droites 15 µl d'une solution acétone-eau (1:1) contenant 80 µg d'huile de croton comme agent irritant afin de provoquer une inflammation cutanée.

Les souris des groupes traitées reçoivent localement 2 mg/oreille d'extrait ou 0,5 mg d'indométacine, simultanément avec l'agent phlogogénique. L'épaisseur de l'oreille est mesurée par un pied à coulisse digital avant le traitement et 6 heures après l'induction de l'inflammation (Delaporte et *al.*, 2004) et la différence de l'épaisseur avant et après l'application de l'huile de croton est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin qui ne reçoit que la solution d'huile de croton selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'inhibition} = (\Delta \text{ Témoin} - \Delta \text{ Traité} / \Delta \text{ Témoin}) \times 100$$

$\Delta$  Témoin: différence d'épaisseur pour le groupe témoin.

$\Delta$  Traité: différence d'épaisseur pour le groupe traité.

### **II.6.2. Poche d'air induite par la carragénine chez la souris**

La méthode décrite par Liz et ses collaborateurs (2011) est utilisée pour réaliser le test de la poche d'air induit par la  $\lambda$ -carragénine chez la souris. Pour cela, les poches d'air ont été créées par une injection sous dermique de 3 ml d'air stérile au premier jour et de 2 ml au troisième jour de l'expérience. Lors du 6<sup>ème</sup> jour, les souris reçoivent directement dans la poche d'air 1 ml soit de NaCl stérile (0.9%), d'E.AE (1 mg/ml), d'E.But (1 mg/ml) ou d'indométacine (0.1 mg/ml). Une heure après, l'inflammation aigue est induite par l'injection directe dans chaque poche de 0.1 ml de  $\lambda$ -carragénine à 1%. Les souris sont ensuite sacrifiées quatre heures après l'injection de la carragénine, les poches d'air sont lavées avec 1 ml de NaCl stérile contenant de l'héparine (20 UI/ml). Les exsudats sont collectés et les leucocytes ayant migrés vers la poche sont comptés à l'aide d'une cellule de Thoma sous microscope optique.

### **II.6.3. Inhibition de la dénaturation des protéines**

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits étudiés est évaluée suivant le protocole décrit par Lavanya et *al.* (2010) qui se base sur la capacité de ces extraits à réduire la dénaturation thermique d'albumine sérique bovine (BSA). Pour cela, 450 µl de la solution aqueuse de BSA à 5 % est ajoutée à 50 µl de chaque extrait (E.AE ou E.But à 125, 250 et 500 µg/ml) ou d'aspirine comme anti-inflammatoire de référence avec les mêmes concentrations. Le contrôle est préparé de la même façon en remplaçant la solution d'extrait par l'eau distillée. Les pH de toutes les solutions sont ajustés à 6.3, avant de les incuber à 37°C pendant



20 min. Ensuite, la température est augmentée à 57°C pendant 3 min, suivie d'un refroidissement. Un volume de 2.5 ml de tampon phosphate (0.2 mM, pH=6.3) est ajouté aux solutions.

L'absorbance est lue à 420 nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé selon l'équation suivante:

$$\% \text{ d'inhibition de dénaturation} = (A_c - A_t/A_c) \times 100$$

A<sub>c</sub> : absorbance du contrôle

A<sub>t</sub> : absorbance de la solution test

#### **II.6.4. Stabilité membranaire des érythrocytes humains**

Le protocole décrit par Debnath et *al.* (2013) est utilisé dans cette étude pour évaluer la capacité des extraits d'*A.unedo* à protéger la membrane des érythrocytes humains contre l'hémolyse induite par un milieu hypotonique. Pratiquement, 100 µl d'une suspension érythrocytaire diluée à 10% dans un milieu isotonique (tampon phosphate 10 mM, pH=7.4, 154 mM NaCl) sont ajoutés à 1 ml de chaque extrait ou de Diclofénac (référence) à différentes concentrations (1, 2, 3 mg/ml) dissous dans un milieu hypotonique (10 mM tampon phosphate, pH=7.4, 50 mM NaCl). Le contrôle qui est considéré comme 100% d'hémolyse ne contient que la suspension érythrocytaire avec le milieu hypotonique. Le mélange réactionnel est ensuite incubé 10 minutes à température ambiante, puis centrifugé à 3000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. L'absorbance du surnageant récupéré est lue à 450 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 \times (A_1 - A_2)/ A_1$$

A<sub>1</sub> : absorbance du contrôle négatif

A<sub>2</sub> : absorbance de l'extrait ou du référence

#### **II.7. Analyses statistiques**

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne ± SD, et en moyenne ± SEM pour les tests *in vivo*. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 Demo. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA univarié suivi du test de Tukey ou Dunnett. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0.05 (p < 0.05).

**RESULTATS**

**&**

**DISCUSSION**

## RESULTATS ET DISCUSSION

### I. Analyses phytochimiques

#### I.1. Polyphénols totaux et flavonoïdes

Les fractions d'acétate d'éthyle et butanolique sont séchées jusqu'à l'obtention d'une poudre fine hygroscopique de couleur brune. L'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles d'*Arbutus unedo* a donné un rendement de 4%, qui est plus faible que celui de l'extrait butanolique (7,5%).

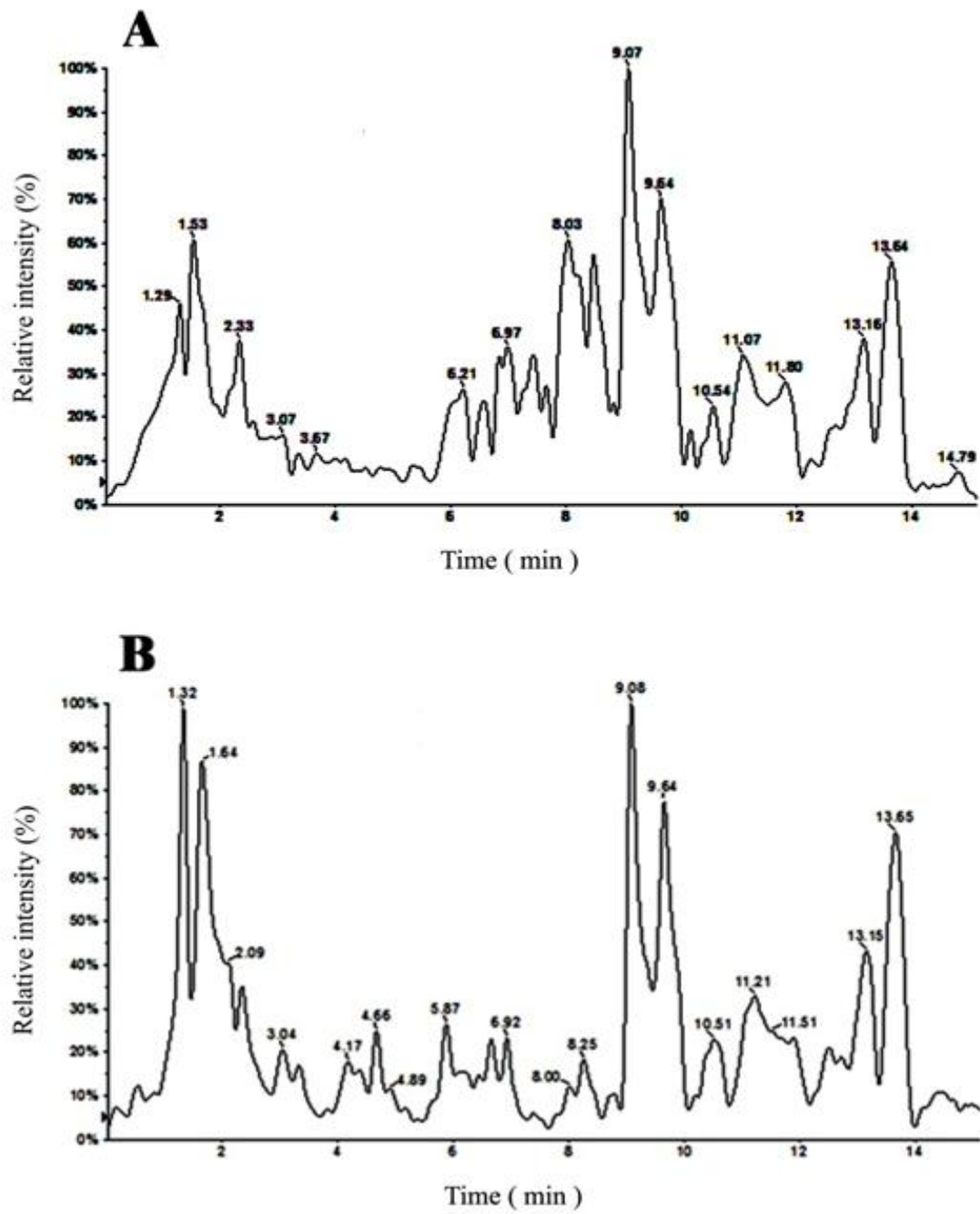
Le contenu des deux extraits en composés phénoliques et en flavonoïdes est résumé dans le **tableau 1**. Les résultats montrent que l'E.AE est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'E.But.

**Tableau 1.** Teneur des extraits E.AE et E.But d'*Arbutus unedo* en polyphénols totaux et flavonoïdes. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

Extrait	Polyphénols	Flavonoïdes
	$\mu\text{g}$ équivalent acide gallique/mg extrait	$\mu\text{g}$ équivalent quercétine/mg extrait
E. AE	$836.51 \pm 90.54$	$53.99 \pm 5.33$
E. But	$559.33 \pm 68.74$	$3.75 \pm 0.19$

#### I.2. Caractérisation phytochimique par LC-ESI/MS

L'analyse quantitative par LC-ESI/MS révèle la présence de 9 acides phénoliques et 11 flavonoïdes dans les deux extraits d'*A. unedo* (**Tableau 2**). Les conditions de séparation utilisées ont permis d'obtenir des chromatogrammes bien résolus (**Figure 16**). L'acide gallique, l'epicatechin, la procyanidine B2, l'acide éllagique, la quercétine et l'acide chlorogénique sont détectés comme constituants majeurs dans les deux extraits étudiés, tandis que, l'acide caféique, l'acide transcinamaldehyde, le luteolin et l'acide rosmarinique n'ont été détectés que dans l'extrait d'acétate d'éthyle (**Tableau 2**).



**Figure 16.** Profils chromatographiques de l'E.AE (A) et l'E.But (B) d'*Arbutus unedo* obtenus par LC-ESI/MS.

**Tableau 2.** Composés phénoliques identifiés par LC-ESI/MS dans l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et l'extrait butanolique (E.But) d'*Arbutus unedo*.

<b>Compounds</b>	<b>R<sub>t</sub></b>	<b>E.AE (ng/ml)</b>	<b>E.But (ng/ml)</b>
<b>Gallic acid</b>	2.58	39600	2800
<b>Catechol</b>	4.50	1360	43.1
<b>Vanilic acid</b>	6.22	2.02	7.50
<b>Procyanidin B2</b>	6.37	10100	712
<b>Chlorogenic acid</b>	6.55	2210	1220
<b>P-Coumaric acid</b>	6.61	62.2	181
<b>Epicatechin</b>	6.67	11500	1300
<b>Isoquercitrin</b>	6.87	67.2	106
<b>Myrtillin</b>	6.88	101	112
<b>Quercetin3-O-galactoside</b>	6.87	63.1	420
<b>Rutin</b>	7.18	514	405
<b>Caffeic acid</b>	7.61	16.1	N/A
<b>Transcinamaldehyde acid</b>	7.79	32.1	N/A
<b>Rosmarinic acid</b>	7.79	896	N/A
<b>Cyanin acid</b>	8.12	63.6	23.9
<b>Ferulic acid</b>	8.24	649	17.9
<b>Luteolin</b>	8.32	50.5	N/A
<b>Ellagic acid</b>	8.36	9750	585
<b>Quercetin</b>	8.38	6150	327
<b>Apigenin</b>	8.71	71.3	14.0

R<sub>t</sub>: temps de rétention, N/A : not available

L'extraction par les solvants organiques est souvent la méthode la plus pratiquée pour la préparation des extraits de plantes. Cependant, certains auteurs ont montré que le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios sont les solvants les plus utilisés pour une meilleure récupération de composés phénoliques (Sahreem et al., 2010, Khoddami et al., 2013).

Avant son utilisation, le matériel végétal est séché à l'abri de la lumière puis broyée. Le séchage de la plante à l'obscurité a pour but d'éviter toute éventuelle dégradation enzymatique des flavonoïdes, particulièrement les glycosides (Marston and Hostettmann, 2006), ou microbiennes (Seidel, 2005), comme il prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et la dégradation causées par les radiations UV (Jones and Kinghorn, 2005). Tandis que le broyage de la plante rend l'extraction plus efficace, en effet, l'échantillon devient plus homogène, la surface de contact avec le solvant est plus grande, la

pénétration à l'intérieur des cellules qui ne sont pas détruites après le broyage devient aussi plus facile.

Dans la présente étude, l'extraction a été faite dans un premier temps par macération dans un mélange méthanol/eau. Le méthanol est capable d'augmenter la perméabilité des parois cellulaires et de faciliter l'extraction d'un grand nombre de composés polaires ainsi que des composés de moyenne et de faible polarité et cela par modulation de la polarité de ces derniers, probablement à cause de l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions aqueuses et la solubilisation des molécules (Seidel, 2005 ; Albano and Miguel, 2010), ceci d'une part. D'autre part, la présence d'eau dans le mélange hydro-alcoolique augmenterait la perméabilité des tissus végétaux et favoriserait le phénomène de diffusion de masse dans l'étape d'extraction (Arimboor and Arumughan, 2011).

Le rendement de l'extraction dépend de plusieurs facteurs, à savoir la méthode d'extraction, le temps, la température, le solvant utilisé et la nature chimique de l'échantillon (Tabart et *al.*, 2007 ; Terblanche et *al.*, 2017), le nombre de répétitions de l'extraction de l'échantillon (khoddami et *al.*, 2013), ainsi que la présence de substances interférentes (Stalikas, 2007). L'origine géographique de la plante (climat et sol), la saison de la récolte, la durée et les conditions de stockage influencent également le rendement d'extraction (Liu et *al.*, 2015). La délipidation augmente aussi le rendement d'extraction en composés phénoliques (khoddami et *al.*, 2013).

El Haouari et *al.* (2007) ont obtenu à partir des extraits des feuilles d'*Arbutus unedo* originaire de Maroc un rendement de 0.84% avec l'éther diéthylique et 5.21% avec l'acétate d'éthyle. Ce résultat est similaire à celui obtenu dans cette étude (4%) avec l'acétate d'éthyle. Par contre, Mekhfi et *al.* (2006), ont obtenu à partir de l'extrait brut aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo* du Maroc un rendement de 12.5%.

Afin de caractériser les extraits préparés à partir des feuilles d'*A.unedo*, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué car la majorité des effets pharmacologiques et des propriétés antioxydantes des plantes sont attribués à ces substances (Gülçin et *al.*, 2010).

Il paraît dans cette analyse que l'extrait d'acétate d'éthyle d'*A.unedo* est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait butanolique, et cela est peut être dû à la différence de solubilité de ces composés dans les deux solvants utilisés qui ont des degrés de polarité différents. En utilisant la chromatographie sur couche mince, Males et *al.* (2006) ont montré

la présence de quercitrine, d'isoquercitrine, d'hyperoside, de rutine et d'acide chlorogénique dans différents extraits d'*A. unedo*. La teneur en flavonoïdes diffère considérablement d'un échantillon de plante à l'autre et cela peut être dû à divers facteurs, tels que le type de sol, les conditions microclimatiques, la position géographique, le site, l'âge et le stade de végétation des plantes et des feuilles. Plusieurs composés ont été isolés d'*A. unedo* collectés en Turquie, notamment des acides aromatiques, des iridoïdes, des monoterpénoïdes, des phénylpropanoïdes, des stérols, des triterpénoïdes et des flavonoïdes (Carcache-Blanco et al., 2006). D'autres études chimiques sur les feuilles et les fruits d'*A. unedo* ont indiqué la présence d'huiles essentielles, de proanthocyanidines, de glucosides iridoïdes, de sucres, d'acides phénoliques et de tocophérol (Ayaz et al., 2000 ; Kivçak and Mert, 2001 ; Kivçak et al., 2001). Ces composés phénoliques possèdent un bon pouvoir pharmacologique et sa présence dans cette plante supporte son usage traditionnel dans la prise en charge de diverses pathologies.

## II. Toxicité aigue

Afin de garantir l'innocuité des extraits étudiés, la toxicité aiguë par voie orale est évaluée dans cette étude sur des souris selon la ligne directrice de l'OCDE 425.

L'administration orale de 2000 mg/kg de poids corporel d'E.AE et d'E.But d'*A. unedo* chez des souris ne provoque aucun signe d'intoxication (changement de comportement, manque d'appétit, difficultés motrices, dyspnée...etc.), ni de mortalité pendant les 14 jours d'observation. De plus, aucune diminution ni augmentation significative n'est observée dans le gain du poids corporel. Par conséquent, ces deux extraits peuvent être déclarées non toxiques à la dose de 2000 mg/kg, et la DL<sub>50</sub> est donc supérieure à cette dose. Ces résultats servent de base pour le choix des doses et des concentrations pour les expériences ultérieures.

Les résultats de la présente étude sont en concordance avec ceux de Bnouham et ses collaborateurs (2007), qui ont étudié la toxicité aigue de l'extrait aqueux des racines d'*Arbutus unedo*. Ils ont rapporté que même à une dose de 6000 mg/kg de poids corporel administrés à des souris par voie orale, cet extrait n'a pas provoqué de mortalité ou des effets secondaires. Ce résultat appuie l'absence d'effets indésirables de cette plante.

### III. Activité antioxydante *in vivo* des extraits d'*Arbutus unedo*

L'effet de l'E.AE et l'E.But d'*Arbutus unedo* sur les taux du malondialdéhyde et du glutathion réduit, et sur l'activité de la catalase et de la superoxyde dismutase a été évalué au niveau des surnagent du foie des souris traités. Ces paramètres forment des marqueurs biologiques endogènes du stress oxydant qui permettent de mettre en évidence les dommages causés par les radicaux libres et l'état des différents systèmes de défense.

#### III.1. Effet sur la catalase

La catalase est une enzyme antioxydante qui joue un rôle très important dans le métabolisme du peroxyde d'hydrogène, catalysant sa décomposition en eau et en oxygène moléculaire (Sisein, 2014).

Dans cette étude, l'activité de cette enzyme a été déterminée dans le foie. Les résultats présentés dans le **tableau 3** montrent que le prétraitement des souris par les trois concentrations des deux extraits d'*A. unedo* n'induit aucun changement significatif dans l'activité enzymatique de la catalase. De même, l'administration de l'acide ascorbique ne modifie pas l'activité de cette enzyme. En effet, chez les souris du groupe témoin l'activité de l'enzyme est de  $231.24 \pm 13.32$   $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de protéines.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Celep et ses collaborateurs (2013) qui ont montré que le traitement des animaux pendant 21 jours avec l'extrait méthanolique des feuilles de *Cornus mas* L. à la concentration de 500 mg/Kg préserve le taux d'activité de la catalase, de la SOD et de la GPX et le taux du MDA.

#### III.2. Effet sur SOD

L'activité de la SOD est de  $0.35 \pm 0.03$  et de  $2.44 \pm 0.06\%$  pour le groupe témoin et le groupe traité par l'acide ascorbique respectivement. En revanche, le prétraitement par l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique d'*A. unedo* stimule l'augmentation de l'activité enzymatique de cette protéine (**Tableau 3**).

Ceci est peut être due à la teneur élevée et la composition en polyphénols des extraits. Plusieurs études (Avila-Nava et al., 2014; Kardum et al., 2014 ; Khan et al., 2015; Wu et al., 2015) ont montré l'effet positif des différentes classes de polyphénols sur l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, Catalase et GPX). Cet effet aboutit à la diminution de la peroxydation lipidique. En fait, la réduction de l'activité de ces enzymes augmente la lipoperoxydation dont le produit final est le MDA qui attaque les membranes et conduit



finalement à la perte des fonctions des cellules (Halliwell, 2001). Les mécanismes de l'activation des enzymes antioxydantes par les polyphénols ne sont pas très clairs, car la biodisponibilité de ces molécules est relativement faible (Pincemail et *al.*, 2007), mais certaines études ont mentionné la relation entre les polyphénols et l'expression d'enzymes antioxydantes via l'activation des facteurs nucléaires comme le facteur Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), (Mitjavila and Moreno, 2012; Oliveras-López et *al.*, 2014; Nakayama et *al.*, 2015). Dans les conditions normales, ce facteur Nrf2 se trouve lié à son inhibiteur cytoplasmique sous forme d'un complexe Keap1-Nrf2. Dans le cas d'un stress oxydatif ou en présence de stimulateurs, le facteur Nrf 2 se dissocie de ce complexe, permettant son transfert vers le noyau, où il se lie à une partie de l'ADN appelée antioxidant response element (ARE) ou electrophile response element (EpRE), située dans la région promotrice des enzymes antioxydantes, ce qui augmente leur taux de réplication (Vicente et *al.*, 2014).

### III.3. Effet sur le MDA

Le taux du MDA est déterminé dans le surnageant du foie des souris traités par les extraits d'*Arbutus unedo* en comparaison avec un groupe contrôle négatif et un groupe des souris traités par l'acide ascorbique. L'augmentation du taux du MDA indique l'augmentation de la peroxydation lipidique et les dommages cellulaires (Hamden, 2008).

Le taux du MDA au niveau des surnageant du foie des souris témoins et des souris traités par l'acide ascorbique sont de  $22.25 \pm 1.93$  nmol/mg de protéines et  $26.42 \pm 1.26$  nmol/mg de protéines respectivement. Le traitement avec l'E.AE et l'E. But d'A. *unedo* n'entraîne aucune modification significative du taux du MDA par rapport au groupe contrôle (**Tableau 3**).

La peroxydation lipidique qui cible principalement les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires ou des lipoprotéines (LDL), produit des composés toxiques qui agissent loin de son lieu de génération comme second messenger (Gutowski and Kowalczyk, 2013). Le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (4-HNE) sont les produits majeurs de la peroxydation lipidique (Devasagayam, 2004). L'accumulation de ces métabolites affecte les canaux de transport ionique et perturbe ainsi le passage transmembranaire des protéines et des enzymes et affecte aussi les bicouches lipidiques des membranes qui deviennent plus rigides et/ou perméables (Kehrer and Klotz, 2015). Su et ses collaborateurs (2016), ont rapporté aussi que le MDA peut pénétrer dans la bicouche lipidique membranaire, conduisant à l'endommagement ou à la perte de fonction de la membrane par

durcissement. Ce dernier, réduit la fluidité et augmente la perméabilité de la membrane plasmique, induisant ainsi le gonflement et la nécrose cellulaire.

La présente étude montre que le traitement des souris par l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique d'*A. unedo* préserve le taux du MDA hépatique. Ces résultats prouvent que les extraits d'*A. unedo* peuvent protéger le foie contre le stress oxydant par l'inhibition de la peroxydation lipidique et l'inhibition des réactions d'oxydation en chaîne (Goel et al., 2005). Cette activité des extraits d'*A. unedo* peut être attribuée à leur composition en polyphénols (Bonarska-Kujawa et al., 2011). En fait, plusieurs études suggèrent que les extraits riches en polyphénols et en flavonoïdes présentent une capacité antioxydante en affectant la production de radicaux libres et la peroxydation lipidique. Les antioxydants peuvent retarder ou empêcher l'oxydation des lipides en inhibant l'initiation et/ou la propagation des réactions d'oxydation (Wang and Chen, 2010 ; Jiang et al., 2011).

**Tableau 3.** Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et l'extrait butanolique (E.But) d'*A. unedo* sur la catalase, la SOD, le MDA et le GSH du surnageant hépatique.

	<b>Catalase</b> µmoles/min/mg protéines	<b>SOD</b> U/mg protéines	<b>MDA</b> namoles/mg protéines	<b>GSH</b> namoles/mg protéines
Contrôle (NaCl)	231.24 ± 13.32	0.35± 0.03	22.25 ± 1.93	49.57 ± 4.26
Vit C150 mg/Kg	274.56 ± 15.74 ns	2.44± 0.06***	26.42 ± 1.26 ns	67.79 ± 4.69***
E.AE 75 mg/Kg	256.35 ± 14.39 ns	2.30± 0.09***	21.93 ± 1.93 ns	12.24 ± 0.68***
E.AE 150 mg/Kg	227.90 ± 16.36 ns	2.56± 0.19***	24.21 ± 1.40 ns	12.51 ± 1.07***
E.AE 300 mg/Kg	236.38 ± 25.01 ns	2.54± 0.22***	20.33 ± 1.41 ns	12.13 ± 1.08***
E.But 75 mg/Kg	293.51 ± 15.11 ns	2.20± 0.07***	21.13 ± 1.22 ns	17.89 ± 1.22***
E.But 150 mg/Kg	263.68 ± 9.32 ns	2.21± 0.08***	20.28 ± 1.31 ns	14.03 ± 1.31***
E.But 300 mg/Kg	277.02 ± 21.92 ns	2.17± 0.08***	21.26 ± 1.54 ns	14.49 ± 0.47***

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n = 10). ns: non significatif, \*\*\*: p<0.001 vs le contrôle (traitement par le NaCl).

### III.4. Effet sur GSH

Le glutathion est un pseudo-tripeptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine. Il joue un rôle important dans la défense antioxydante en participant dans plusieurs réactions de détoxification et d'élimination d'espèces réactives de l'oxygène. Il intervient aussi dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme et dans la régulation de plusieurs activités cellulaires telles que l'expression des gènes, la synthèse de l'ADN et des protéines, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la transduction du signal, la production de cytokines et la réponse immunitaire (Wu et al., 2004).

Les trois concentrations testées des deux extraits étudiés n'ont pas augmenté le taux de glutathion réduit (**Tableau 3**) par rapport au groupe traité à l'eau physiologique ( $49.57 \pm 4.26$  nmol/mg de protéines). Le prétraitement par l'acide ascorbique augmente significativement ce taux jusqu'à  $67.79 \pm 4.69$  nmol/mg de protéines. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que le contenu des deux extraits en phénols totaux n'a pas affecté le taux de glutathion.

Le système antioxydant GSH se compose du glutathion réduit GSH et d'enzymes, dont la glutathion réductase GR est responsable de la régénération du GSH, et la glutathion peroxydase GPX et la Glutathion S-transférase GST travaillent ensemble avec le GSH pour la décomposition du peroxyde d'hydrogène et des anions superoxydes (Huo et *al.*, 2011; Lavie, 2015). Plusieurs études ont rapporté que la diminution du taux de GSH est associée à une augmentation de la peroxydation des lipides (Akilavalli et *al.*, 2011 ; Kaushik et *al.*, 2011 ; Nasir et *al.*, 2013). Par contre, l'augmentation du taux de GSH pourrait être due à la synthèse ou à la régénération du GSH et l'activation de la glutathion réductase (Nasir et *al.*, 2013).

#### IV. Activité antioxydante *in vitro*

Diverses actions peuvent être à l'origine du pouvoir antioxydant, à savoir l'inhibition des enzymes d'oxydation, la chélation des métaux de transition, le transfert d'hydrogène, la désactivation de l'oxygène singlet ou la détoxification enzymatique des ROS. Pour cela et afin de caractériser le potentiel antioxydant des principes actifs et des extraits, la combinaison de différentes méthodes est une obligation (Popovici et *al.*, 2009).

Dans le présent travail, l'activité antioxydante des extraits d'*A. unedo* a été évaluée *in vitro* en utilisant: le test de l'hémolyse oxydative induit par AAPH, le test au DPPH, ABTS, OH $\cdot$ , O $_2^{\cdot-}$  et H $_2$ O $_2$  pour tester l'effet piègeur, la technique de décoloration du  $\beta$ -carotène et l'activité antioxydante totale pour évaluer l'effet sur la peroxydation lipidique, et enfin la mesure du pouvoir réducteur.

##### IV. 1. Effet protecteur des extraits contre l'hémolyse érythrocytaire

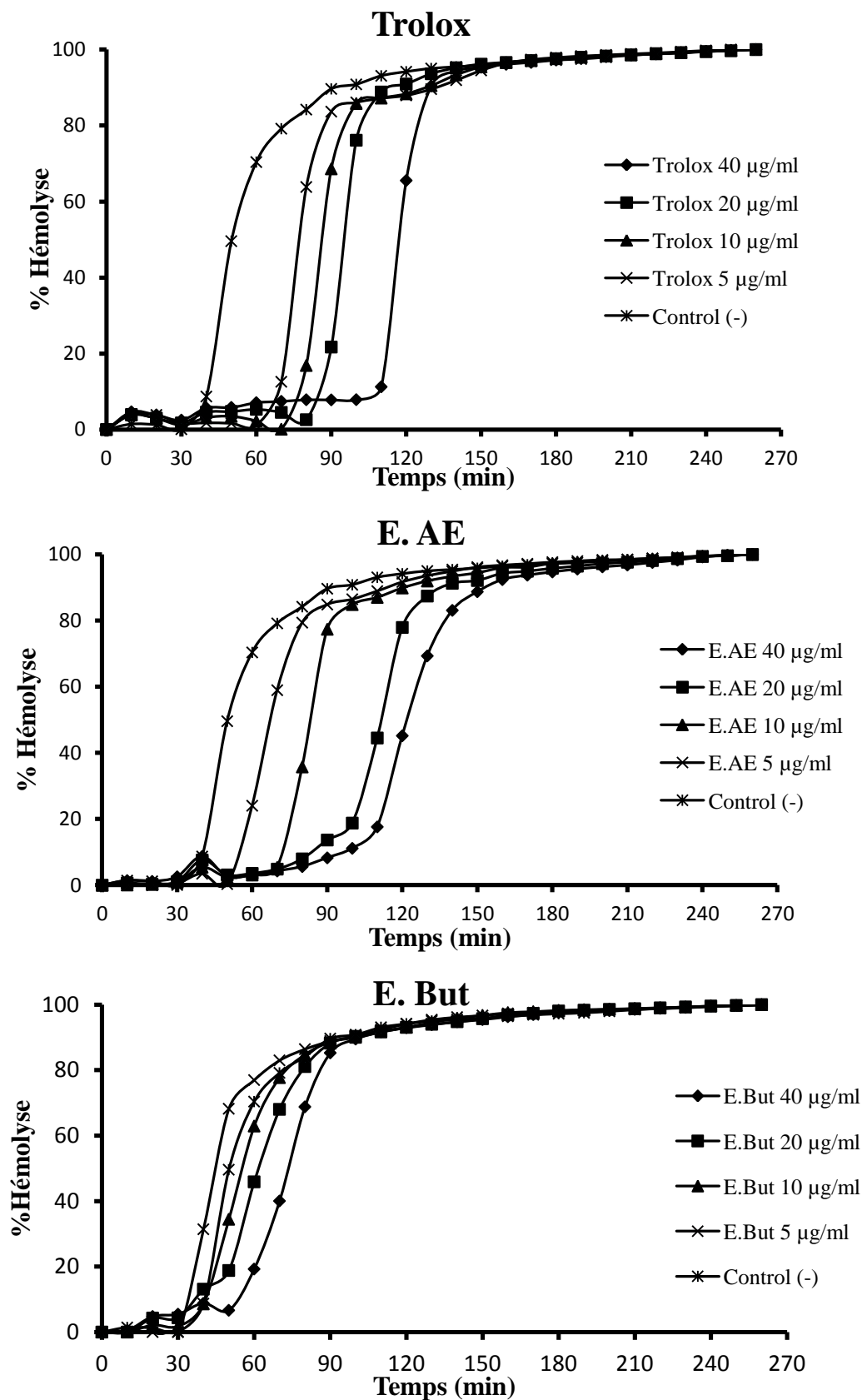
Les résultats obtenus des extraits d'*Arbutus unedo* et du trolox (utilisé comme référence) sont présentés sur la **figure 17** et le **tableau 4**. Les deux extraits étudiés induisent une extension du temps de demi-hémolyse (HT $_{50}$ ) en comparaison avec le contrôle négatif. Cela signifie qu'ils ont la capacité à protéger les hématies d'un stress oxydant, ce qui confirme leur activité antihémolytique. L'effet est dose-dépendant. Le meilleur effet protecteur est obtenu

avec l'E.AE qui donne un effet très proche de celui exercé par le trolox. A la dose de 40 µg/ml, les valeurs des HT<sub>50</sub> sont 122.02 min et 115.26 min pour l'E.AE et Trolox respectivement. Ces résultats sont significativement plus importants que ceux obtenus avec l'E.But à la même dose (HT<sub>50</sub>=73.48 min) et aussi le contrôle négatif (HT<sub>50</sub>= 46.5min).

**Tableau 4.** Activité anti-hémolytique de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE), de l'extrait butanolique (E.But) d'*Arbutus unedo* et du Trolox à différentes concentrations.

<b>Temps de demi-hémolyse (min)</b>				
<b>Echantillon</b>	<b>5µg/ml</b>	<b>10µg/ml</b>	<b>20µg/ml</b>	<b>40µg/ml</b>
E. AE	66.67 ± 1.15**	81.04 ± 3.73***	109.42 ± 2.03***	122.02 ± 3.51***
E. But	49.15 ± 4.55 ns	56.68 ± 3.12**	62.86 ± 1.00***	73.48 ± 2.63***
Trolox	68.03 ± 8.10 **	79.95 ± 2.54***	92.59 ± 4.87***	115.26 ± 5.77***
contrôle	46.50 ± 0.56			

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD. \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; ns: Non significatif vs contrôle.



**Figure 17.** Cinétique de l'hémolyse érythrocytaire induite par l'AAPH en présence de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE), l'extrait butanolique (E.But) d'*Arbutus unedo* et du Trolox. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

Dans cette étude, le test de l'hémolyse érythrocytaire induit par l'AAPH est utilisé comme modèle cellulaire pour vérifier la résistance globale du sang à l'attaque radicalaire en présence des extraits d'*Arbutus unedo*. C'est un modèle idéal pour évaluer au mieux l'étude des dommages oxydatifs des membranes induit par les radicaux libres générés et déterminer l'activité antioxydante des extraits (Deng et al., 2006 ; Kunwar et al., 2007) dont la durée est suffisamment longue pour que l'ensemble des mécanismes chimiques et enzymatiques de défenses cellulaires puissent agir. De plus, les cellules érythrocytaires forment la première cible des attaques des radicaux libres en raison de la présence de deux promoteurs très importants des espèces réactives de l'oxygène à savoir, la richesse de la membrane en acides gras polyinsaturés et le transport d'O<sub>2</sub> associé à la molécule d'hémoglobine (Varghes et al., 2013). Les radicaux libres et les oxydants en général, sont capables de provoquer des dommages architecturaux au niveau des membranes érythrocytaires et cela par oxydation des lipides et des protéines qui les composent (Yang et al., 2006). La déstabilisation de la membrane cellulaire est attribuée à la production de radicaux libres, tels que les peroxydes de lipides. Une lésion au niveau de la membrane plasmique des hématies rendra la cellule plus sensible aux endommagements y compris la peroxydation lipidique induite par les radicaux libres (Arzanlou et al., 2011).

Dans cette étude, les deux extraits d'*Arbutus unedo* protègent la membrane érythrocytaire contre la lyse induite par l'AAPH. Leur capacité à retarder l'hémolyse pourrait être attribuée à sa teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes. En effet, des études antérieures ont rapporté que les polyphénols et les flavonoïdes sont capables de protéger les érythrocytes de l'hémolyse oxydative induite par les radicaux libres et d'augmenter leur résistance aux dommages causés par les oxydants (Chaudhuri et al. , 2007, De Freitas et al., 2008). De même, Alvarez-Suarez et al. (2012) et Henneberg et al. (2013) ont montré que les flavonoïdes peuvent pénétrer dans les bicouches lipidiques des érythrocytes et se lier à la membrane plasmique inhibant ainsi la peroxydation des lipides et renforcer l'intégrité des globules rouges contre l'hémolyse. Niki et al., (1988) ont rapporté que durant l'oxydation des érythrocytes provoquée par les radicaux libres issus de la décomposition thermique de l'AAPH, c'est l'acide ascorbique et l'acide urique présents dans le plasma qui agissent en premier temps comme piègeurs de ces radicaux, ensuite c'est l' $\alpha$ - tocophérol situé au niveau de la bicouche lipidique de la membrane érythrocytaire qui agit majoritairement sur ces molécules réactives.

**IV.2. Activité anti-radicalaire**

**IV.2.1. Effet piègeur du radical DPPH**

Un piègeur de radicaux DPPH est toute substance capable de saturer ses couches externes en fournissant un atome d'hydrogène ou un électron (Que et al, 2006).

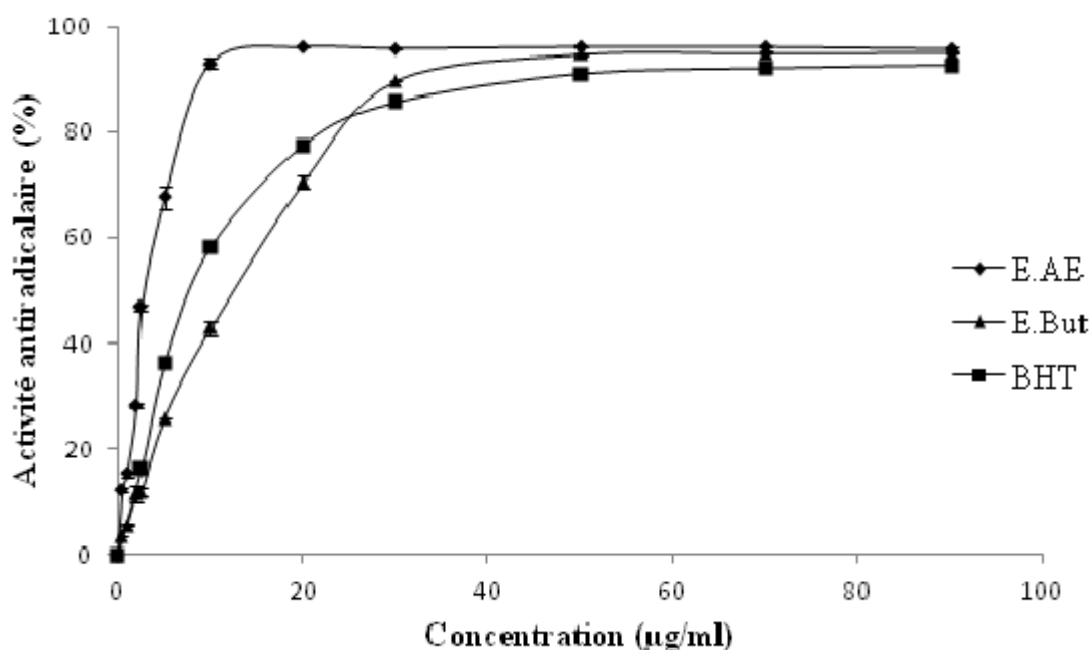
Les résultats de la présente étude montrent que les deux extraits étudiés d'*A. unedo* possèdent un effet piègeur très important (**Figure 18**). L'activité anti-radicalaire de la fraction butanolique est proche de celle obtenue avec l'antioxydant standard (BHT), tandis que l'E.AE a montré un effet meilleur.

Les concentrations capables de piéger 50% du radical DPPH dans le milieu réactionnel (IC<sub>50</sub>) sont représentées dans le **tableau 5**. Les différences entre les extraits et le BHT et entre les extraits eux-mêmes sont statistiquement significatives.

Ces résultats sont bien en corrélation avec la teneur en polyphénols qui peuvent être à l'origine de cette activité anti-radicalaire.

**Tableau 5.** Valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits d'*Arbutus unedo* et de BHT. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD. \*\*\* : P≤0,001 vs le BHT.

<b>Echantillon</b>	<b>IC<sub>50</sub> (µg/ml)</b>
Extrait d'acétate d'éthyle	3.43 ± 0,07***
Extrait butanolique	13,77 ± 1.01***
BHT	8.21 ± 0,12



**Figure 18.** Activité antiradicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) des feuilles d'*Arbutus unedo* et du BHT vis-à-vis du radical DPPH. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

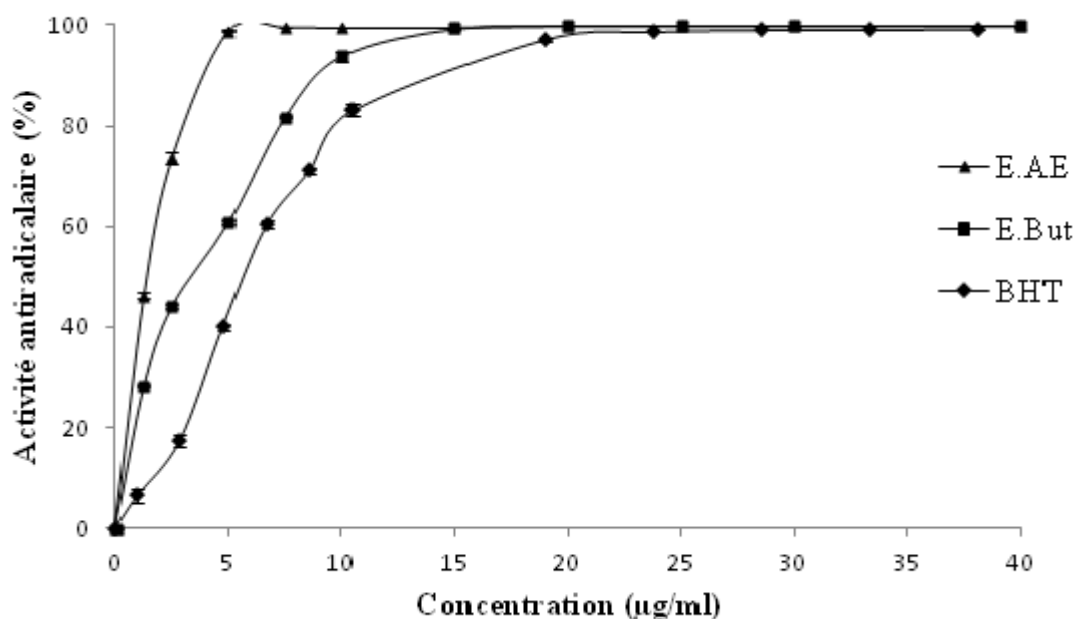
#### IV.2.2. Effet piègeur du radical ABTS

Dans ce test, l'activité anti-oxydante des extraits des feuilles d'*A. unedo* a été évaluée en suivant la décoloration du radical ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). Les résultats sont présentés dans la **figure 19**. L'extrait d'acétate d'éthyle a montré une activité beaucoup plus élevée que celles de BHT, utilisé comme référence et de l'extrait butanolique qui ont exhibé le même effet.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Pabuçcuoğlu et *al.* (2003), qui ont démontré que les extraits éthanolique et méthanolique préparés à partir des feuilles de cette même plante présentent un excellent effet antioxydant dans le test d'ABTS.

Les IC<sub>50</sub> obtenues sont représentées dans le **tableau 6**. Les différences sont statistiquement significatives entre l'extrait d'acétate d'éthyle et le BHT mais non significatives entre ce dernier et l'extrait butanolique.





**Figure 19.** Activité antiradicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) des feuilles d'*Arbutus unedo* et du BHT vis-à-vis du radical ABTS. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

**Tableau 6.** Valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits d'*Arbutus unedo* et de BHT. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD. \*\*\* :  $P \leq 0,001$ , NS: non significatif vs le BHT.

Echantillon	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Extrait d'acétate d'éthyle	1.59 $\pm$ 0,02***
Extrait butanolique	6.27 $\pm$ 0.08 NS
BHT	6.10 $\pm$ 0,12

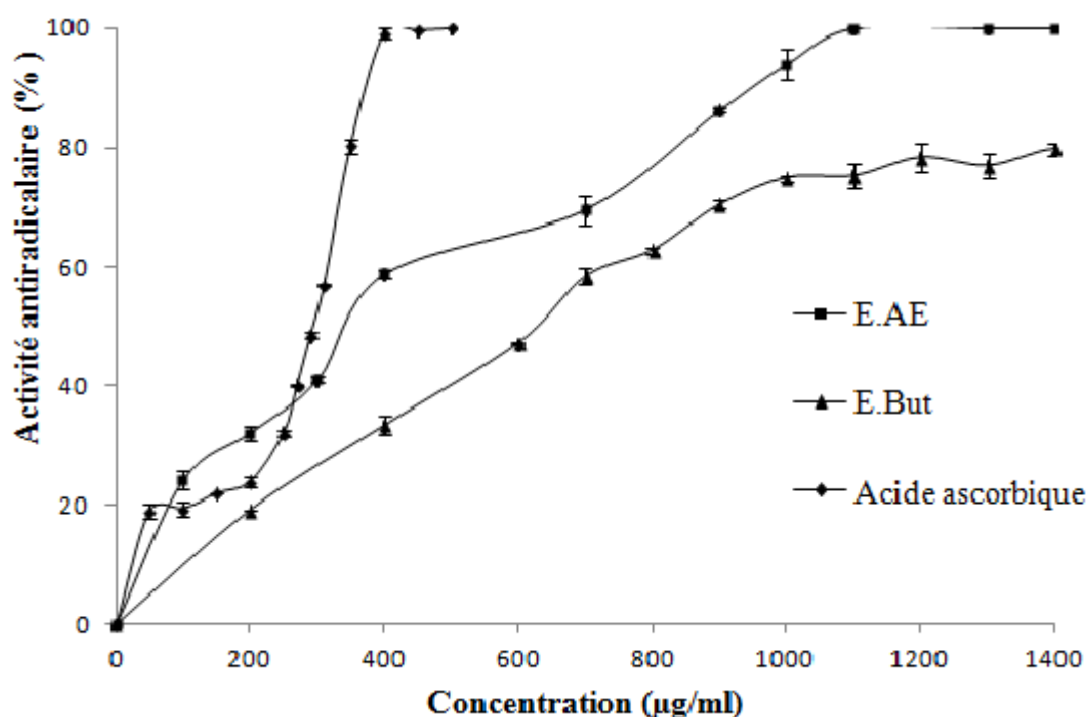
#### IV.2.3. Effet piègeur du radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>) est considéré comme l'espèce réactive de l'oxygène la plus réactive et qui peut induire de graves dommages oxydatifs aux biomolécules (Ozsoy et al., 2008). Il attaque les protéines, l'ADN, les acides gras polyinsaturés dans les membranes et la plupart des molécules avec lesquelles il entre en contact (Nagulendran et al., 2007). Il est capable d'extraire les atomes d'hydrogène des lipides membranaires induisant ainsi la peroxydation lipidique, qui est le processus clé de plusieurs pathologies.

Les résultats obtenus suggèrent que les extraits d'*A. unedo* sont des piègeurs de radicaux hydroxyles. Cette capacité de piégeage peut être due à leur richesse en composés phénoliques. En effet, l'E.AE qui est riche en ces composés a présenté le meilleur effet (**figure 20**) avec une  $IC_{50} = 323,45 \mu\text{g/ml}$  par rapport à la fraction butanolique, mais les deux effets restent plus faibles que celui de l'acide ascorbique (**tableau 7**).

**Tableau 7.** Valeurs des  $IC_{50}$  des extraits d'*Arbutus unedo* et de l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD. \*\*\* :  $P \leq 0,001$ , \*\* :  $P \leq 0,01$ , NS: non significatif vs l'acide ascorbique.

Echantillon	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Extrait d'acétate d'éthyle	$323.45 \pm 5.97^{**}$
Extrait butanolique	$611.20 \pm 9.86^{***}$
Acide ascorbique	$290.26 \pm 0.01$

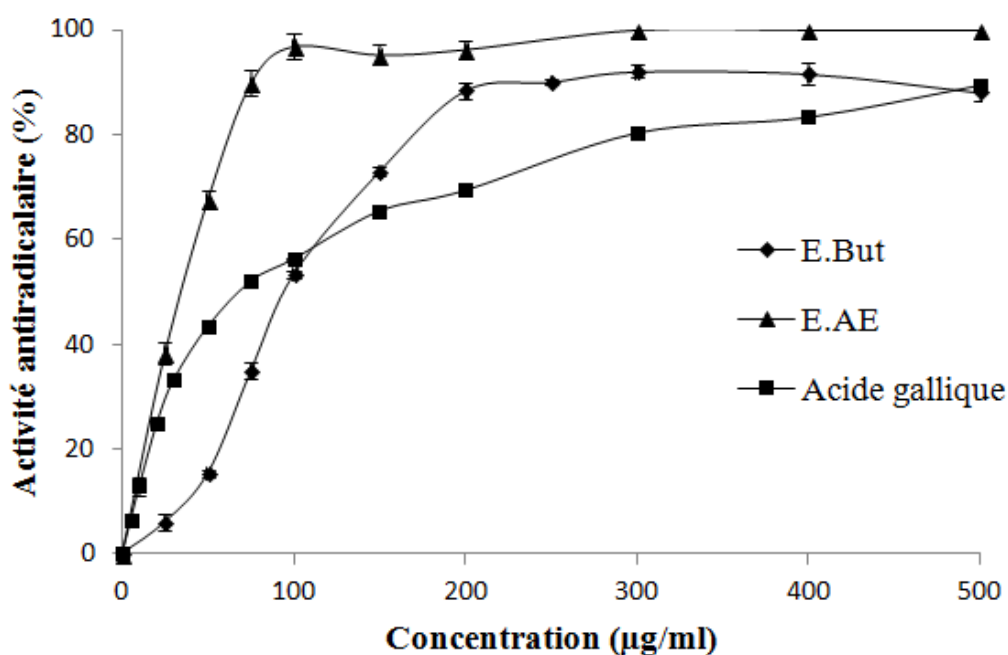


**Figure 20.** Activité anti-radicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) des feuilles d'*Arbutus unedo* et du BHT vis-à-vis du radical OH. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

#### IV.2.4. Effet piègeur d'anion superoxyde

A l'état normal, les radicaux anions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) sont produits de manière endogène par plusieurs enzymes oxydantes telles que la xanthine oxydase. Dans cette étude,

les anions superoxyde ont été dérivés dans un système non enzymatique (PMS-NADH-NBT) à partir de l'oxygène dissous par la réaction de couplage PMS-NADH qui réduit le NBT (Gülçin et *al.*, 2005 ; Inbathamizh et *al.*, 2013). Ces radicaux peuvent directement initier la peroxydation lipidique et endommager ainsi les biomolécules (Nagulendran et *al.*, 2007), et ses effets peuvent être amplifiés en produisant d'autres ROS contribuant aux lésions tissulaires et à diverses maladies (Ozsoy et *al.*, 2008). La capacité des extraits d'*A. unedo* à piéger les anions superoxyde, comme le montre la **figure 21**, est concentration dépendante. L'extrait d'acétate d'éthyle a montré une activité beaucoup plus élevée que celles de l'acide gallique, utilisé comme référence et de l'extrait butanolique qui a montré l'effet le plus faible avec une IC<sub>50</sub> de 103,80 µg/ml (**tableau 8**). Ces différences sont statistiquement significatives.



**Figure 21.** Activité antiradicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) des feuilles d'*Arbutus unedo* et du BHT vis-à-vis du radical O<sup>•</sup><sub>2</sub>. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais ± SD.

**Tableau 8.** Valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits d'*Arbutus unedo* et de l'acide gallique. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD. \*\*\* : P≤0,001 vs l'acide gallique.

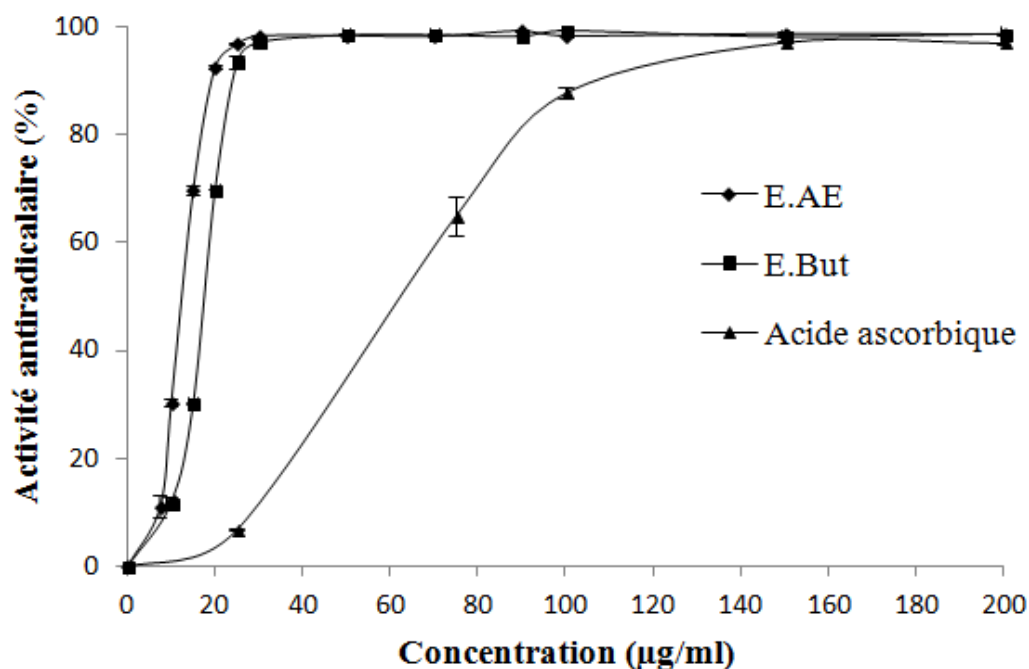
Echantillon	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Extrait d'acétate d'éthyle	38.40 ± 1.29***
Extrait butanolique	103.80 ± 2.11***
Acide gallique	52.24 ± 1.10

**IV.2.5. Effet piègeur du peroxyde d'hydrogène**

Le peroxyde d'hydrogène est toxique pour les cellules puisqu'il traverse rapidement les membranes cellulaires et produit de nombreux radicaux hydroxyles réactifs par la réaction de Fenton avec des ions Fe<sup>2+</sup>, et éventuellement des ions Cu<sup>2+</sup> (Keser et al., 2012). Il peut inactiver directement quelques enzymes par oxydation de groupements thiols (Nagulendran et al., 2007).

Comme le montre la **figure 22**, les extraits étudiés d'*A. unedo* ont exhibé une forte capacité de piégeage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par rapport à l'acide ascorbique utilisé comme standard, cet effet est concentration dépendant. À la concentration de 100 µg/ml, les deux extraits ont exercé le même pourcentage d'activité de piégeage de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (98%). Cet effet est plus important que celui obtenu avec l'acide ascorbique (87%).

Les concentrations capables de piéger 50% d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le milieu réactionnel (IC<sub>50</sub>) sont représentées dans le **tableau 9**. Les différences entre les extraits et l'acide ascorbique et entre les extraits eux-mêmes sont statistiquement significatives.



**Figure 22.** Activité anti-radicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) des feuilles d'*Arbutus unedo* et du BHT vis-à-vis du radical H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais ± SD.

**Tableau 9.** Valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits d'*Arbutus unedo* et de l'acide ascorbique. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais ± SD. \*\*\* : P≤0,001 vs l'acide ascorbique.

Echantillon	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Extrait d'acétate d'éthyle	11.56 ± 0.18***
Extrait butanolique	27.13 ± 0.49***
Acide ascorbique	61.84± 1.56

L'extrait d'acétate d'éthyle s'est avéré posséder la forte activité de piégeage contre le DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•</sup>, OH<sup>•</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'O<sup>•-2</sup> et ces résultats sont bien corrélés avec le contenu phénolique, démontrant la capacité de l'acétate d'éthyle à extraire une quantité considérable de polyphénols et flavonoïdes qui sont responsables d'activités antioxydantes dans de nombreuses espèces végétales (Gülçin *et al.*, 2013).

Il a été prouvé que les composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes sont responsables de l'effet scavenger des radicaux libres (Zhang and Tsao, 2016) et leur effet est principalement attribué à leur propriété d'oxydo-réduction, qui peut jouer un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres par leur capacité de donation d'hydrogène (Prasad et

*al.*, 2010). Les flavonols glycosides et les tanins pourraient être les principes actifs responsables de l'activité antioxydante des feuilles d'*A.unedo* (Pabuçcuoğlu et *al.*, 2003). L'activité antioxydante de ces composés est principalement due à leurs propriétés redox, qui peuvent neutraliser des radicaux libres par leur capacité de donation d'hydrogène (Prasad et *al.*, 2010), la désactivation de l'oxygène singlet ou la diminution des peroxydes (Gülçin et *al.*, 2010). Ces polyphénols contiennent des structures cycliques conjuguées et des groupes hydroxyles qui peuvent agir comme antioxydants en piégeant les radicaux libres, les radicaux peroxydes lipidiques et en stabilisant les radicaux libres impliqués dans ces processus oxydatifs (Priyadharshini and Sujatha, 2012). De plus, il a été rapporté que les activités antioxydantes des acides phénoliques et de leurs dérivés dépendent du nombre de groupes hydroxyles dans les molécules (Soobrattee et *al.*, 2005)

### IV.3. Effet sur la peroxydation lipidique

#### IV.3.1. Blanchiment du $\beta$ -carotène

Les cinétiques de blanchissement du  $\beta$ -carotène en présence et en absence des extraits d'*A. unedo* ainsi que du BHT sont présentés dans la **figure 23**. Les absorbances initiales des contrôles négatifs aqueux et méthanolique sont 0.671 et 0.703 et les valeurs minimales après 120 min sont de 0.018 et 0.093 respectivement. Ceci indique une peroxydation totale du  $\beta$ -carotène, tandis que les absorbances du BHT et des deux extraits d'*A.unedo* (E.AE et E.But) varient de 0.735, 0.670 et 0.727 au temps 0 à des valeurs finales de 0.692, 0.616 et 0.630 respectivement, indiquant une forte activité antioxydante par rapport aux contrôles négatifs.

Les résultats montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle et le BHT ont les mêmes activités antioxydantes de 92% (**Figure 24**). Cette valeur est supérieure à celle de l'extrait butanolique (85%) mais la différence n'est pas significative.

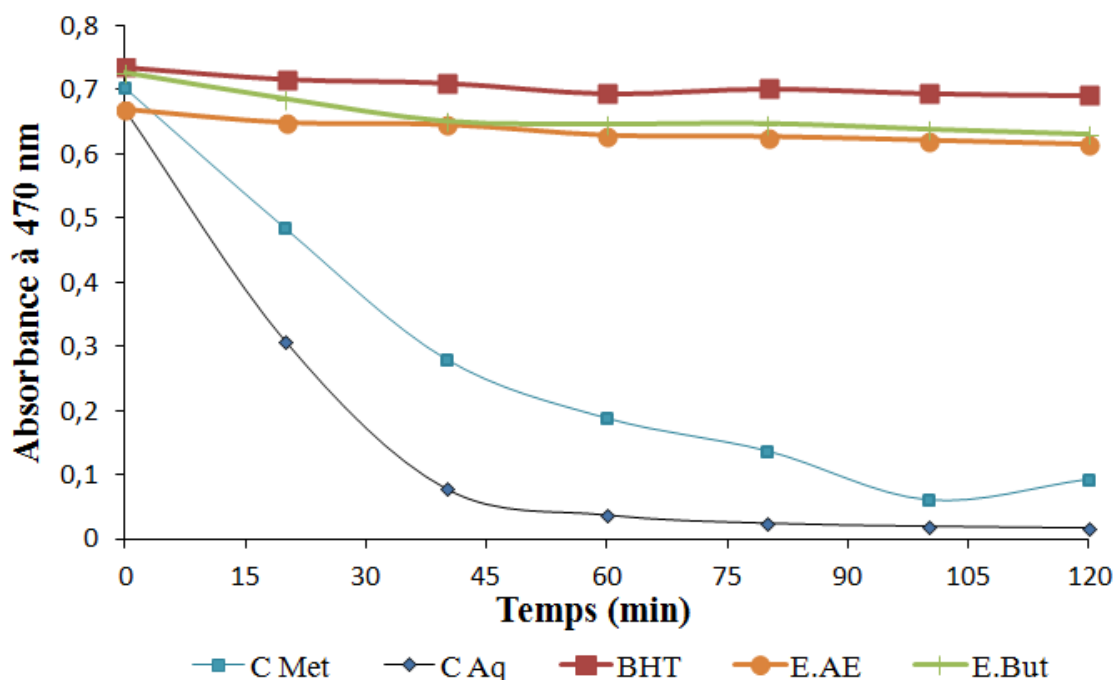


Figure 23. Cinétique de blanchissement du  $\beta$ -carotène à 470 nm en présence et en absence des extraits des feuilles d'*Arbutus unedo* et de BHT. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

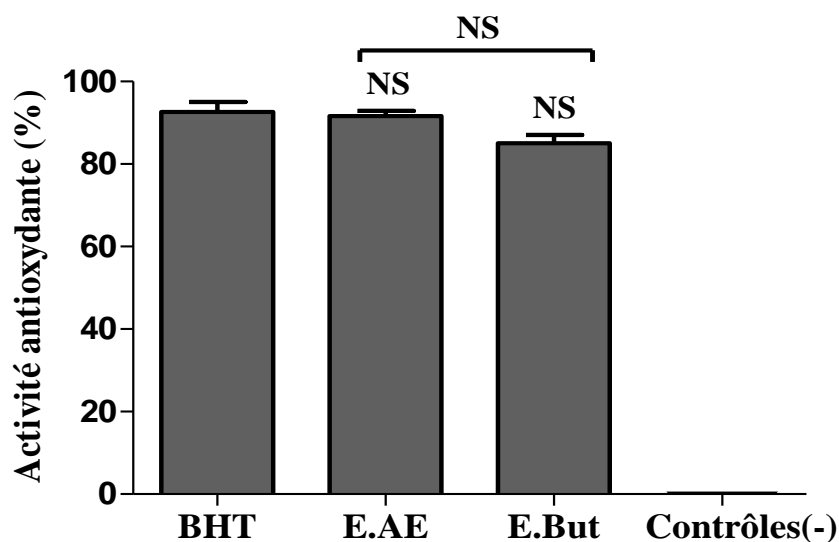
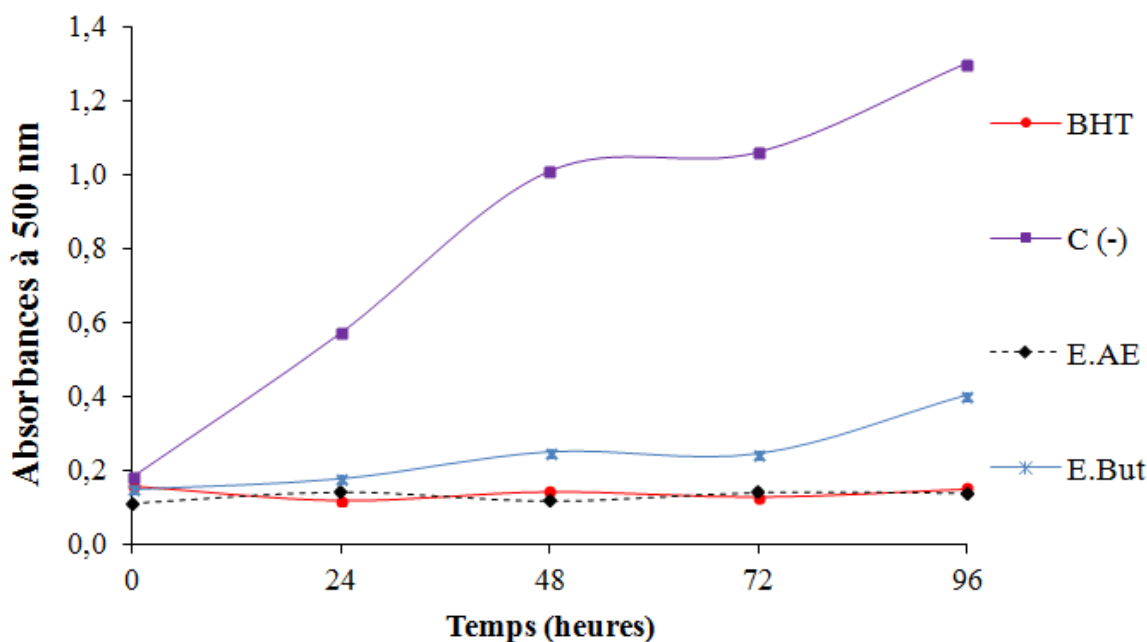


Figure 24. Activité antioxydante des extraits (E.AE et E.But) d'*Arbutus unedo* et de BHT dans le système  $\beta$ -carotène/acide linoléique. Les valeurs sont la moyenne de trois essais  $\pm$  SD. La comparaison est réalisée avec le BHT; NS: non significatif.

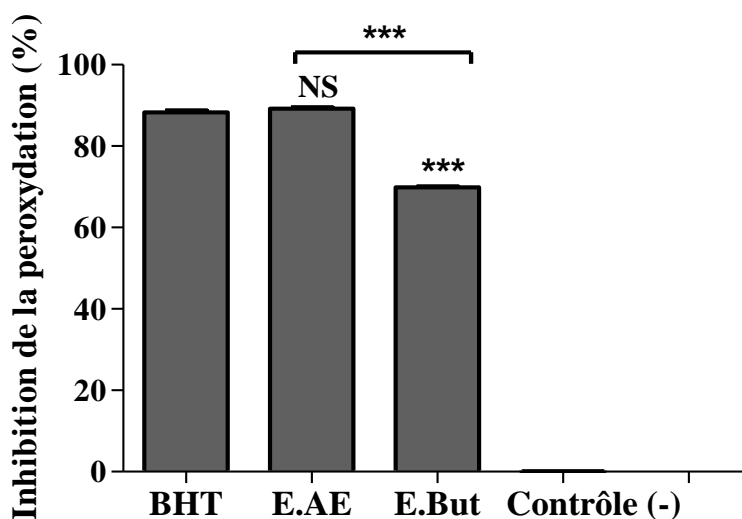
#### IV.3.2. Effet sur la peroxydation de l'acide linoléique

La figure 25 montre la cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits étudiés et du BHT. Les absorbances sont stables tout au long des 96 heures, indiquant une forte activité antioxydante par rapport au contrôle négatif.

A une concentration de 50 µg/ml, l'extrait d'acétate d'éthyle et le BHT exercent un effet inhibiteur de la peroxydation de 89% et 88% respectivement au temps 96 heures. Ces valeurs sont significativement supérieures à celle de l'extrait butanolique qui exerce un effet inhibiteur de 70% à la même concentration (**Figure 26**).



**Figure 25.** Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits (E.AE et E.But) d'*Arbutus unedo* et du BHT à 500 nm. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD.



**Figure 26.** Activité inhibitrice de la peroxydation de l'acide linoléique des deux extraits d'acétate d'éthyle (E. AE) et butanolique (E. But) d'*Arbutus unedo* et du BHT au temps 96 h et à une concentration de 50µg/ml. Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures ± SD; \*\*\* : P≤0,001, NS: non significatif par rapport au BHT.



La peroxydation lipidique *in vivo* est l'altération oxydative des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires, catalysée par les radicaux libres. Afin de déterminer la capacité des extraits d'*A. unedo* à inhiber cette peroxydation, le test de blanchissement du  $\beta$ -carotène et le test de peroxydation de l'acide linoléique ont été utilisés. Ces deux tests paraient très utiles comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria et al., 2006).

Dans le premier test, Les radicaux libres provenant de l'abstraction des atomes d'hydrogène à partir de groupements méthylènes de l'acide linoléique attaquent le  $\beta$ -carotène et induisent sa décoloration. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait soit inhiber l'oxydation de l'acide linoléique soit neutraliser les radicaux libres, ou les deux en même temps et donc prévenir la dégradation oxydative et le blanchissement du  $\beta$ -carotène (Naidu et al., 2011). Ce test est largement utilisé pour mesurer l'activité antioxydante des composés bioactifs du moment que le  $\beta$ -carotène est hautement insaturé, donc il est extrêmement susceptible aux radicaux peroxydes dérivés de l'acide linoléique (Kumazawa et al., 2002). En plus, le  $\beta$ -carotène est l'un des colorants naturels les plus utilisés en industries agroalimentaires et pharmaceutiques, ainsi sa décoloration sera nettement à l'origine de la réduction de la qualité de ces produits (Bougatef et al., 2009).

L'effet inhibiteur de la peroxydation lipidique des extraits a été aussi déterminé par la méthode de thiocyanate ferrique dans un système contenant l'acide linoléique. Dans ce test, les peroxydes issus de l'oxydation de l'acide linoléique attaquent les ions ferreux et les transforment en forme ferrique. Ces derniers forment un complexe avec l'ammonium thiocyanate qui a un maximum d'absorption à 500nm indiquant l'oxydation de l'acide linoléique (Gülçin et al., 2005). Les résultats de cette étude montrent que les extraits d'*A.unedo* exercent un excellent effet sur la peroxydation lipidique. Le blanchiment du  $\beta$ -carotène ainsi que la peroxydation de l'acide linoléique ont été fortement ralenties en présence des deux extraits.

Un extrait capable de retarder ou inhiber l'oxydation du  $\beta$ -carotène peut être décrit comme un capteur de radicaux libres et un antioxydant primaire (Liyana-Pathirana and Shahidi, 2006). L'effet des extraits étudiés sur la peroxydation lipidique pourrait être dû soit à l'inhibition directe de la peroxydation de l'acide linoléique ou à leur propriété de piéger des hydroperoxydes issus de la peroxydation de l'acide linoléique (Tepe et al., 2005; Aslan et al., 2006). En fait, au cours de la peroxydation lipidique, les antioxydants peuvent agir de différentes façons à savoir la décomposition des peroxydes et la chélation des ions

métalliques. Souvent, plus d'un seul mécanisme sont impliqué pour avoir un effet en synergie (Moure et *al.*, 2001).

Les résultats des deux tests utilisés montrent la capacité des extraits à réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre ainsi la chaîne de réactions radicalaires. Cela reflète aussi la solubilité des composés antioxydants dans l'émulsion, dont la présence limite l'oxydation du  $\beta$ -carotène et de l'acide linoléique (Tepe et *al.*, 2005). Cet effet est fort probablement attribué au contenu phénolique et flavonoïdique des extraits. Sandhar et ses collaborateurs (2011) ont démontré la capacité des flavonoïdes à inhiber la peroxydation lipidique à un stade précoce par l'activité scavenger des radicaux peroxydes ou à interrompre une chaîne de réactions radicalaires par la propriété de donation d'hydrogène. De même, Takahama (1983) a montré que les flavonoïdes ont la capacité de terminer la réaction en chaîne de la peroxydation des lipides par le piégeage du radical peroxyde LOH $\cdot$ .

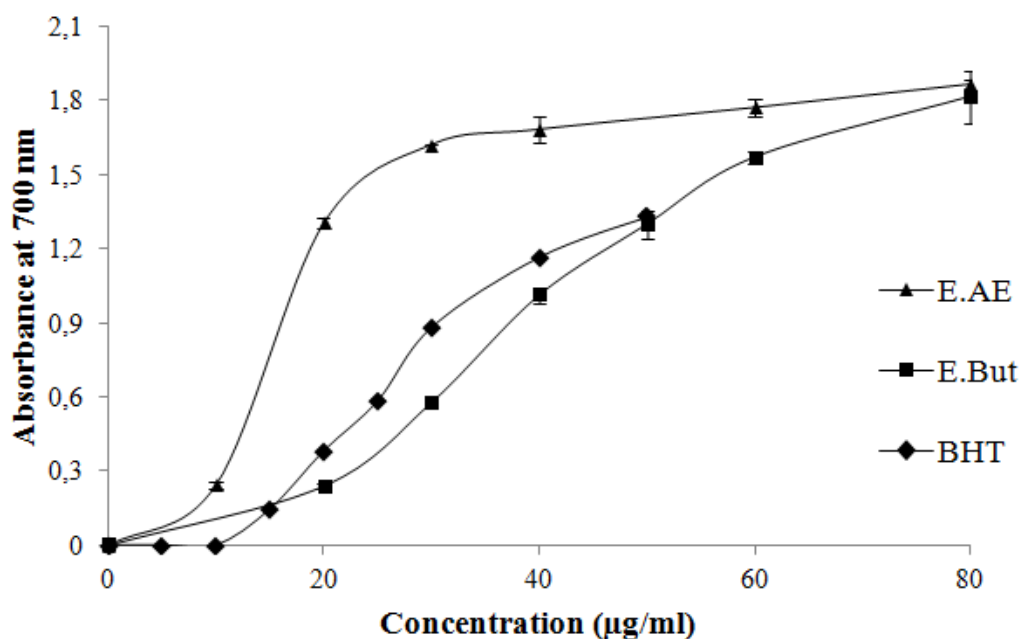
**IV.4. Pouvoir réducteur**

Les résultats montrent que les deux extraits d'*A. unedo* possèdent un pouvoir réducteur concentration-dépendant (**Figure 27**).

L'E.AE a montré un meilleur pouvoir réducteur que celui obtenu avec l'E.But. Le BHT montre une activité réductrice maximale à 50  $\mu$ g/ml. Les EC<sub>50</sub> sont représentées dans le **tableau 10**.

**Tableau 10.** Les EC<sub>50</sub> des extraits d'*Arbutus unedo* et du BHT. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD. \*\*\* : P $\leq$ 0,001, NS: non significatif vs le contrôle positif.

<b>Echantillon</b>	<b>EC<sub>50</sub> (<math>\mu</math>g/ml)</b>
Extrait d'acétate d'éthyle	12.25 $\pm$ 0.75***
Extrait butanolique	21.47 $\pm$ 0,92 NS
BHT	23.09 $\pm$ 0.89



**Figure 27.** Pouvoir réducteur des extraits d'acétate d'éthyle et butanolique d'*Arbutus unedo* et du BHT à 700nm. Les valeurs représentent la moyenne de trois essais  $\pm$  SD.

Le pouvoir réducteur est la capacité de donation d'électrons dans une réaction d'oxydoréduction. Cette propriété peut être aussi utilisée dans l'évaluation de l'activité antioxydante d'un composé. La présence de réducteurs dans les extraits réduit directement le complexe  $\text{Fe}^{3+}(\text{CN}^-)_6$  en  $\text{Fe}^{2+}(\text{CN}^-)_6$ , ce dernier peut être évalué par spectrophotométrie à 700nm en suivant l'augmentation de l'intensité de la couleur qui est directement proportionnelle au pouvoir réducteur de l'échantillon étudié (Yadav et *al.*, 2012).

Les deux extraits étudiés ont exercé un pouvoir réducteur important, et cela démontre donc leur capacité de donation d'électrons et par conséquent leur capacité de neutraliser les radicaux libres. Cette propriété pourrait être due à la présence de composés phénolique, notamment les flavonoïdes qui sont des principaux donneurs d'électrons d'après Le et *al.* (2007). De nombreux travaux ont prouvé une forte corrélation entre le contenu en polyphénols et flavonoïdes des extraits de plantes et leur activité antioxydante et réductrice (Rebaya et *al.*, 2016 ; Parikh and Patel, 2017).

#### IV.5. Test phosphomolybdate (PPM)

Le test au phosphomolybdène est une méthode spectrophotométrique qui a été développée pour la détermination quantitative de la capacité antioxydante totale (Prieto et *al.*, 1999). La formation d'un complexe de couleur verte de phosphate et de molybdène Mo(V) a été présentée par Fiske et Subbarow (1925) comme la base d'une méthode

spectrophotométrique pour déterminer le phosphate inorganique. Cette méthode a été révisée ensuite et modifiée par Chen et *al.* (1956) pour la détermination de toute espèce réductrice. Le dosage est basé sur la réduction de molybdène Mo(VI) par les antioxydants et la formation subséquente d'un complexe vert de phosphate / molybdène Mo(V) à pH acide et à température élevée.

Les extraits d'*A. unedo* ont montré une forte activité antioxydante totale, en réduisant le complexe de phosphomolybdène (**tableau 11**). L'E.AE exerce l'effet le plus puissant.

**Tableau 11.** Capacité antioxydante totale des extraits E.AE et E.But d'*Arbutus unedo*. Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD.

Extrait	E.AE	E.But
TAC ( $\mu\text{g}$ équivalent acide ascorbique/mg extrait)	986.66 $\pm$ 35.87	484.60 $\pm$ 62.41

TAC : total antioxidant capacity.

La capacité des extraits à réduire le phosphomolybdène peut être attribuer au contenu en composés phénolique, et peut être s'expliquer par le fait que le transfert d'électrons/hydrogène des antioxydants se produit à différents potentiels redox dans différents systèmes, et le transfert lui-même dépend également de la structure des antioxydants (Loo et *al.*, 2008).

## **V. Activité anti-inflammatoire des extraits d'*Arbutus unedo***

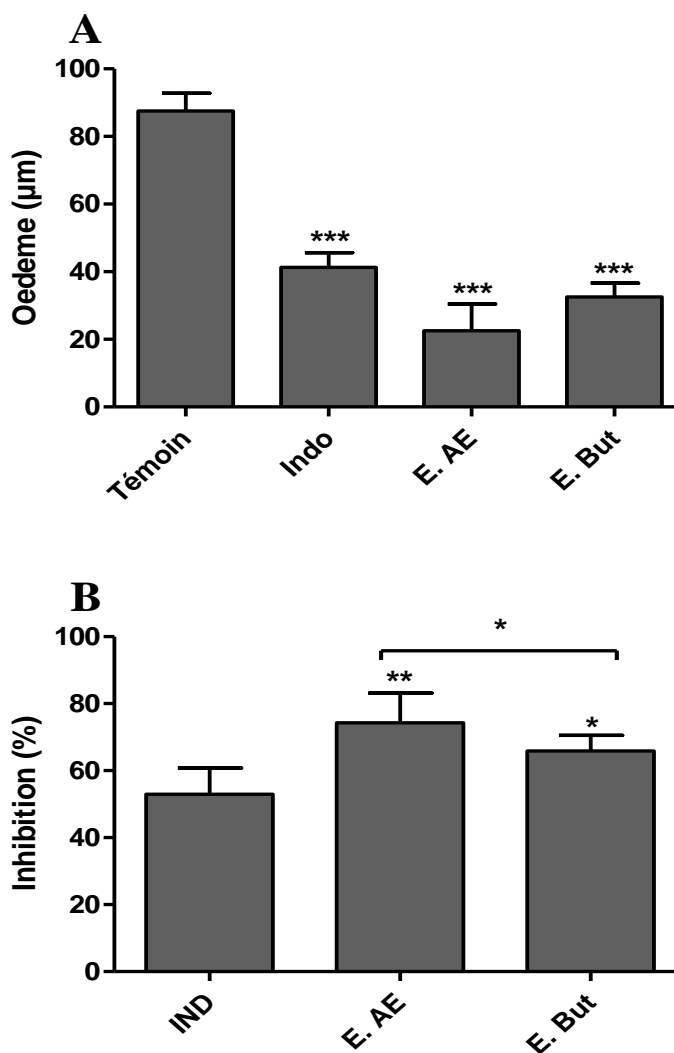
Dans cette étude, les propriétés anti-inflammatoires de l'extrait d'acétate d'éthyle et de l'extrait butanolique des feuilles d'*A. unedo* ont été évaluées on utilisant deux modèles d'inflammation *in vivo* et deux modèles *in vitro*.

### **V.1. Effet des extraits sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris**

L'effet anti-œdémateux (traitement local) de l'extrait d'acétate d'éthyle et de l'extrait butanolique d'*A. unedo* a été évalué en utilisant l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris comme modèle d'inflammation aigue.

Les souris du groupe témoin ayant reçu uniquement la solution d'huile de croton ont développé au bout de 6 heures un œdème d'oreille de  $88 \pm 5.3 \mu\text{m}$ . Le traitement par 2 mg/oreille d'extrait d'acétate d'éthyle et d'extrait butanolique a induit une atténuation significative ( $p < 0.001$ ) de l'inflammation par rapport au groupe témoin. En effet, avec une

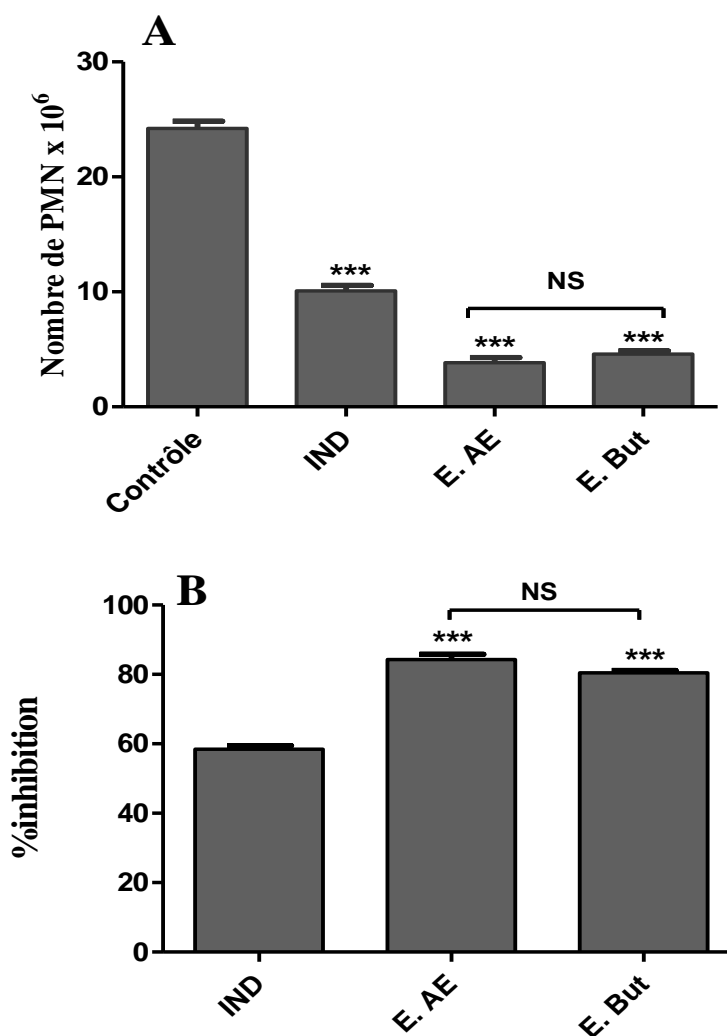
augmentation d'épaisseur de 23 $\mu$ m et 33 $\mu$ m respectivement, les taux d'inhibition exercés par ces deux extraits sont de 74% et 66% respectivement. Ces pourcentages d'inhibition sont supérieurs à celui obtenu avec l'indométacine utilisé comme anti-inflammatoire de référence. En effet, l'augmentation de l'épaisseur 6 heures après l'induction de l'inflammation par 0.5 mg/oreille d'indométacine est de 41 $\pm$ 4.4  $\mu$ m, ce qui correspond à une inhibition de 53% (Figure 28).



**Figure 28.** Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et l'extrait butanolique (E.But) d'*A. unedo* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. L'œdème est induit par application topique de 80  $\mu$ g d'huile de croton sur la face interne de l'oreille droite. Les souris sont traitées localement par 2 mg/oreille d'E.AE ou E.But ou par 0.5mg/oreille d'indométacine (IND). Le groupe témoin reçoit uniquement la solution d'huile de croton. **A** : Différence de l'épaisseur de l'oreille avant l'induction de l'œdème et 6 heures après. La comparaison est faite par rapport au groupe témoin. **B** : Pourcentage d'inhibition de l'œdème. La comparaison est faite par rapport à l'indométacine. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  SEM (n=10). \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$  (ANOVA univarié suivie du test de tukey).

V.2. Effet des extraits sur la poche d'air

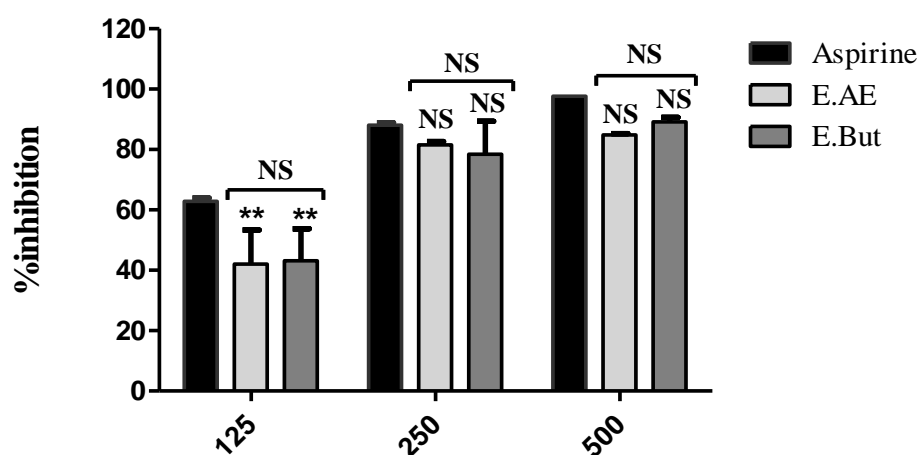
L'injection de 0.1 ml de  $\lambda$ -carragénine à 1% dans la poche d'air a provoqué au bout de quatre heures une inflammation aiguë caractérisée par une infiltration de  $24.22 \pm 6.28 \times 10^6$  leucocytes/ml dans l'exsudat chez les souris du groupe témoin. Le traitement par 1 mg/poche d'E.AE ou E.But d'*A.unedo*, réduit significativement le nombre de leucocytes infiltrés dans l'exsudat avec des taux de réduction de 85.45% et 80.49% respectivement. L'effet inhibiteur exercé par ces extraits est meilleure que celui obtenu avec 0.1 mg/poche d'indométacine (58.46%), (Figure 29).



**Figure 29.** Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et de l'extrait butanolique (E.But) des feuilles d'*A.unedo* sur l'infiltration des leucocytes vers la poche d'air. L'inflammation est induite par l'injection de 0.1 ml de  $\lambda$ -carrageenan (1%) dans la poche d'air. Une heure avant l'induction de l'inflammation, les souris sont traitées par 1 mg/poche d'extrait ou 0.1 mg/poche d'indométacine (IND). **A** : Différence du nombre de leucocytes infiltrés dans l'exsudat 4 heures après l'induction de l'inflammation. La comparaison est faite par rapport au groupe témoin. **B** : Pourcentage d'inhibition de l'infiltration des leucocytes vers la poche d'air. La comparaison est faite par rapport à l'indométacine. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n=10). \*\*\* :  $p < 0.001$ , NS : non significatif (ANOVA univarié suivie du test de tukey).

### V.3. Effet des extraits sur la dénaturation des protéines

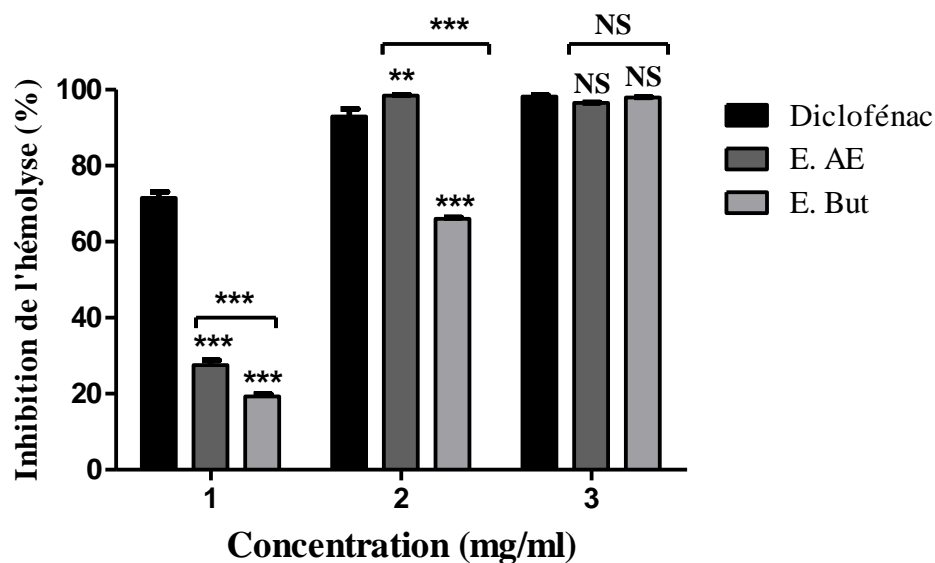
Le traitement avec les trois concentrations étudiées (125, 250 et 500 µg/ml) des deux extraits d'*Arbutus unedo* protègent la BSA contre l'oxydation de manière concentration dépendante. A la concentration de 500 µg/ml, l'E.AE et l'E.But inhibent la dénaturation du BSA à 85% et 89% respectivement. Cette inhibition est statistiquement proche à celle de l'anti-inflammatoire de référence (**Figure 30**).



**Figure 30.** Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et de l'extrait butanolique (E.But) des feuilles d'*A. unedo* sur la dénaturation de BSA. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  SD (n=3). \*\* :  $p < 0.01$ , NS : non significatif par rapport à l'aspirine. (ANOVA bivarié suivie du test de tukey).

### V.4. Effet des extraits sur la stabilité membranaire des érythrocytes humains

Dans ce test, le milieu hypotonique induit une altération de la membrane plasmique des érythrocytes humains, conduisant ainsi à l'hémolyse de ces dernières. Le traitement par les extraits d'*A. unedo* protège de manière très significative ( $p < 0.001$ ) les érythrocytes contre cette hémolyse et cet effet protecteur est concentration-dépendant. A la concentration de 3 mg/ml, les pourcentages d'inhibition de la lyse membranaire sont de 96% et 97% pour l'E.AE et l'E.But respectivement contre 98% exercé par le diclofénac (**Figure 31**).



**Figure 31.** Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et de l'extrait butanolique (E.But) des feuilles d'*A. unedo* sur la lyse des érythrocytes humains induite par un milieu hypotonique. La comparaison est faite par rapport au diclofénac utilisé comme produit de référence. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SD (n=3). \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$ , NS : non significatif. (ANOVA bivarié suivie du test de tukey).

L'inflammation est un processus complexe des tissus vasculaires en réponse aux divers stimuli nocifs, tels que les agents pathogènes, les cellules endommagées ou les irritants (Silva et al., 2013). Elle est caractérisée par quatre symptômes classiques: la chaleur, la rougeur, le gonflement et la douleur. La mesure de l'œdème forme ainsi un excellent outil pour la quantification de l'inflammation cutanée, induite par les agents phlogistiques.

Dans ce contexte, l'effet anti-inflammatoire des extraits étudiés d'*A. unedo* a été évalué par le modèle de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton. Il s'agit d'un modèle expérimental qui permet d'identifier des substances anti-inflammatoires stéroïdiennes et non stéroïdiennes capables de guérir des maladies inflammatoires de la peau (Oliveira et al., 2013).

L'huile de croton est un agent phlogistique extrait de *Croton tiglium*, son effet irritant est dû au principe actif qu'elle contient (TPA; 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate). L'application topique de cette huile induit une réponse inflammatoire aiguë caractérisée par une production importante de médiateurs pro-inflammatoires, une augmentation de la perméabilité vasculaire conduisant à la formation d'œdème qui atteint son maximum 6 heures après l'application, une infiltration de neutrophiles et une prolifération des cellules épidermiques après 24-48 heures (Ho et al., 2007 ; Michel et al., 2012).



Cette réponse est déclenchée par la protéine kinase C (PKC), qui favorise une augmentation de l'activité de la phospholipase A2 (PLA2), cyclo-oxygénases (COX) et lipo-oxygénases (LOX) avec l'induction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Murakawa et *al.*, 2006 ; Oliveira et *al.*, 2013). Cette enzyme favorise également la sécrétion et l'activation de plusieurs médiateurs immunitaires comme les cytokines et les chemokines qui augmentent et maintiennent la réponse inflammatoire de la peau (Denning, 2004). La PKC catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires en acide arachidonique qui donne ensuite des éicosanoïdes, des prostaglandines (PGs), des leucotriènes et des cytokines et cela après son oxydation enzymatique par les COX ou par les LOX (Oliveira et *al.*, 2013).

Le traitement local des souris par l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Arbutus unedo* réduit significativement le volume de l'œdème induit par l'huile de croton chez les souris. Cet effet est supérieur à celui exercé par l'indométacine utilisé comme anti-inflammatoire de référence. A la même dose, l'extrait butanolique exerce une inhibition significative meilleure que celle induite par l'indométacine, mais inférieure à celle de l'extrait d'acétate d'éthyle.

L'important effet anti-inflammatoire des extraits étudiés d'*Arbutus unedo* suggère qu'ils pourraient agir sur la PLA2, la COX et/ou la LOX qui sont les principaux médiateurs impliqués dans la réaction inflammatoire induite par le TPA. Ces propriétés anti-inflammatoires seraient liées aux profils chimiques de ces extraits, particulièrement à la présence de composés phénoliques (acide gallique, epicatechin, procyanidine B2, acide éllagique, quercetine et acide chlorogénique) qui sont en effet de puissants antioxydants capables d'inhiber l'activité enzymatique. L'application topique de certains flavonoïdes comme la quercetine et la myricetine exerce une forte inhibition de la COX et la LOX (Kim et *al.*, 1993). De même, certains flavonoïdes aglycones tels que l'apigénine, la quercetine, la morine ainsi que les flavones et les flavonols glycosides exercent une activité anti-inflammatoire, lors d'une application topique et orale *in vivo* (Lee et *al.*, 1993).

Les amines vasoactives (histamine et sérotonine) responsables de la formation de l'œdème sont libérées dans les 30 premières minutes après l'application de l'agent irritant, alors que la migration des neutrophiles est mise en évidence environ 1 h après l'irritation (Calder, 2006 ; Nicolaou et *al.*, 2011). Le recrutement des leucocytes au niveau des tissus enflammés est essentiel à la réponse inflammatoire afin de nettoyer le foyer lésionnel et réparer le tissu endommagé. Pour cela, et pour confirmer l'activité anti-inflammatoire des deux extraits d'*A.unedo*, le modèle de la poche d'air induite par la carragénine chez la souris est utilisé pour tester leur effet sur la migration des leucocytes vers le site enflammé.

Les résultats obtenus par cette étude ont montré que le traitement des souris par 1 mg d'extrait d'acétate d'éthyle ou d'extrait butanolique réduit significativement le nombre de leucocytes infiltrés dans la cavité de la poche d'air avec un effet inhibiteur meilleur que celui obtenu avec 0.1 mg/poche d'indométacine. Cette activité est probablement due aux polyphénols et aux flavonoïdes présents dans les extraits et qui ont un effet inhibiteur sur la migration des leucocytes (Kernouf et *al.*, 2018). Ces métabolites exercent leur effet anti-inflammatoire de différentes manières et à différents niveaux de la réaction inflammatoire. Elles inhibent le métabolisme de l'acide arachidonique, les mécanismes de la transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires (Iwalewa et *al.*, 2007), la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion et la génération des espèces réactives de l'oxygène (Eteraf-Oskouei et *al.*, 2015).

L'activité anti-inflammatoire d'*Arbutus unedo* est confirmée par les travaux de Mariotto et ses collaborateurs (2008). En effet, cette équipe a montré que l'extrait aqueux des feuilles d'*Arbutus unedo* atténue significativement la réponse inflammatoire induite par l'injection de la carragénine dans la cavité pleurale des souris. D'après ces auteurs, cet effet semble être corrélé à la réduction de la production d'IL-6, à l'activation successive de STAT3, à la formation d'autres cytokines pro-inflammatoires comme TNF- et IL-1, à l'augmentation du recrutement des neutrophiles et à l'expression des protéines iNOS et COX-2, ce qui permet finalement à réduire les dommages des tissus touchés

La dénaturation des protéines est le processus par lequel la protéine perd sa conformation liée à sa structure tridimensionnelle ou secondaire, suite à son exposition à un agent thermique, infectieux ou chimique (Adarsh et *al.*, 2011), ce qui entraîne la perte des propriétés biologiques de la molécule protéique. Cette dénaturation induit l'exposition de certains sites qui vont devenir des auto-antigènes et qui sont à l'origine de la réaction inflammatoire dans les maladies auto-immunes, telles que les maladies arthritiques, le diabète et le cancer (Dharmadeva et *al.*, 2018). Le mécanisme possible de la dénaturation consiste en l'altération des liaisons électrostatiques, des liaisons hydrogènes, des forces hydrophobes et des ponts disulfure qui maintiennent la stabilité de la structure tridimensionnelle des protéines (Barros et *al.*, 2008).

Plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le phénylbutazone et l'indométhazine inhibent la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, ont aussi la capacité d'inhiber la dénaturation des protéines (Sangeetha et *al.*, 2011). Par conséquent, les substances ayant la capacité d'empêcher la dénaturation des protéines peuvent également aider à prévenir les

troubles inflammatoires et sont ainsi considérés comme des anti-inflammatoires (williams et *al.*, 2008).

D'après nos résultats, les deux extraits étudiés d'*Arbutus unedo* inhibent la dénaturation thermique de BSA, ce qui prouve leur activité anti-inflammatoire. L'activité inhibitrice de la dénaturation des protéines pourrait être attribuée aux différents composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les polyphénols présents dans les extraits qui sont détectés lors des criblages phytochimiques. De nombreuses études ont évalué l'activité anti-inflammatoire de différents extraits de plantes médicinales par l'étude de l'effet inhibiteur de la dénaturation protéique. Les composants des plantes utilisés en médecine traditionnelle exercent leurs effets pharmaceutiques grâce à leur capacité de se lier aux protéines plasmatiques (Duganath et *al.*, 2010). En effet, Dufour et ses collaborateurs (2007) ont rapporté que l'albumine possède une forte affinité pour la quercétine, ce qui pourrait expliquer l'activité protectrice des polyphénols contre la dénaturation thermique de l'albumine.

Dans cette étude, le test de la protection de la membrane érythrocytaire contre la lyse induite par le milieu hypotonique était utilisé pour vérifier le rôle des extraits étudiés dans la préservation de la membrane cellulaire. C'est un modèle d'étude préliminaire de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*, étant donné que la membrane des globules rouges et la membrane des lysosomes ont de structure similaire (Yogannadam et *al.* 2010). Le milieu hypotonique induit l'accumulation excessive des fluides à l'intérieur de la cellule érythrocytaire entraînant ainsi la lyse de sa membrane, accompagnée par l'oxydation et la dégradation de l'hémoglobine.

Les résultats de notre étude montrent que les deux extraits protègent la membrane érythrocytaire contre la lyse induite par l'hypotonicité. Cette activité peut être attribuée à la richesse des extraits d'*Arbutus unedo* en composés polyphénoliques.

Ces extraits exercent probablement leur effet contre la lyse membranaire par leur contenu polyphénolique à travers leur activité anti-oxydante et anti-inflammatoire (Sasikumar et *al.*, 2012).

Plusieurs études ont montré que les flavonoïdes et les saponines exercent une importante activité sur la stabilisation des membranes lysosomales et que les tanins et les saponines peuvent lier des cations et aident à la stabilisation des membranes des érythrocytes (El-Shabrany et *al.*, 1997 ; Oyedapo et *al.*, 2004). De même, Alinkumar et Jibin (2007), ont démontré la capacité des flavonoïdes, des terpènes et des phénols à stabiliser la membrane des globules rouges.

CONCLUSION

&

PERSPECTIVES

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les plantes médicinales restent toujours une source inépuisable de molécules bioactives, ayant montré leurs efficacités dans le traitement de diverses pathologies, tout en prévenant l'apparition des effets secondaires observés lors de l'utilisation des médicaments de synthèse chimique. Le présent travail est une contribution à l'étude du potentiel antioxydant et anti-inflammatoire d'*Arbutus unedo*, surtout que l'étude de la toxicité aigüe montre que les deux extraits étudiés ne sont pas toxiques à la dose de 2000 mg/kg.

L'analyse phytochimique a montré que l'E.AE des feuilles d'*Arbutus unedo* possède les teneurs les plus élevés en polyphénols et en flavonoïdes. L'acétate d'éthyle s'est avéré donc comme le meilleur solvant d'extraction des composés phénoliques, grâce à sa capacité d'extraire les molécules polaires et apolaires. L'analyse par HPLC a permis d'identifier 9 acides phénoliques et 11 flavonoïdes dans les deux extraits. L'acide gallique, l'epicatéchine, la procyanidine B2, l'acide éllagique, la quercétine et l'acide chlorogénique sont détectés comme constituants majeurs des deux extraits étudiés, tandis que, l'acide caféique, l'acide transcinamaldehyde, le luteolin et le cyanin chloride ont été détectés en faibles quantités dans l'extrait d'acétate d'éthyle seulement.

Cette étude montre que les extraits des feuilles d'*A. unedo* présentent un intérêt réel et potentiel dans le traitement de l'inflammation et la protection contre les effets du stress oxydant. En effet, il a été démontré *in vitro* que ces deux extraits ont une activité antioxydante très importante, grâce à leur capacité à piéger les radicaux libres, réduire le fer et à leur tendance d'inhiber la peroxydation lipidique. En plus, ces deux extraits exercent un effet protecteur contre la peroxydation lipidique dans le modèle de l'hémolyse érythrocytaire induite par l'AAPH, avec une augmentation dose dépendante du temps de demi-hémolyse. En outre, la préservation de l'activité de la CAT et du taux de MDA et l'amélioration de l'activité de la SOD reflète également l'effet antioxydant de cette plante.

Les deux extraits étudiés exercent des effets anti-œdémateux importants par application locale dans le modèle de l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton, et inhibent aussi le recrutement des cellules immunitaires vers le site inflammatoire. Cela indique que ces extraits peuvent moduler la production et/ou l'activité de différents médiateurs impliqués dans le développement du processus inflammatoire. En plus, les deux extraits ont préservé la stabilité membranaire et ont inhibé la dénaturation de protéines.

Les résultats de la présente étude montrent que l'*Arbutus unedo* possède des effets antioxydant, antihémolytique, et anti-inflammatoire. Cette plante médicinale pourrait être considérée comme une source intéressante d'agents antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent être utilisée dans le traitement et/ou la prévention contre certaines pathologies d'origine inflammatoire ou lors d'une surproduction de radicaux libres et d'enzymes protéolytiques.

Toutefois, les mécanismes moléculaires par lesquels ces extraits exercent leurs effets restent à explorer, et l'étude nécessite des investigations plus approfondies tout en vérifiant la toxicité subaiguë et chronique qui précèdent toute recommandation d'usage en médecine alternative, leurs effets sur l'expression génétique des médiateurs inflammatoires, des enzymes impliquées dans la production des ROS et des différents antioxydants.

De même, il serait intéressant d'isoler, purifier et identifier les molécules responsables des activités précédentes, en étudiant leurs mécanismes d'action. En plus, il est souhaitable de mener une étude sur la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des principes actifs présents dans ces extraits pour la détermination des doses préventives et thérapeutiques.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adarsh V.M, Ajay K.P, Kavitha D, Anurag K.B. (2011). Antidenaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* *in vitro*. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.*, **2**,1-6.
- Aebi H. (1984). Catalase *in vitro*. *Method. Enzymol.*, **105**, 121-126.
- Afkir S, Nguelefack T.B, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Lahlou S, Ziyat A. (2008). *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats. Part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats. *J. Ethnopharmacol.*, **116**, 288-295.
- Afrin S, Forbes-Hernandez T.Y, Gasparini M, Bompadre S, Quiles J.L, Sanna G, Spano N, Giampieri F, Battino M. (2017). Strawberry-tree honey induces growth inhibition of human colon cancer cells and increases ros generation: a comparison with manuka honey. *Int. J. Mol. Sci.*, **18** (3), 613-633.
- Aguilaniu B, Flore P, Page E, Maitre J, Lacour J.R, Perrault H. (1998). Effects of indomethacin and polyunsaturated fatty acid diet on exercise-induced hypoxaemia in master athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **77**, (1-2), 81-88.
- Akilavalli N, Radhika J, Brindha P. (2011). Hepatoprotective activity of *Ocimum sanctum* Linn. against lead induced toxicity in albino rats. *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, **4** (2) 84-87.
- Akkal S, Louaar S, Benahmed M, Laouer H, Duddeck H, (2010). A new isoflavone glycoside from the aerial parts of *Retama sphaerocarpa*. *Chem. Nat. Compd.*, **46** (5), 719-721.
- Al Ghoulh I, Khoo N.K, Knaus U.G, Griendling K.K, Touyz R.M, Thannickal V.J, Barchowsky A, Nauseef W.M, Kelley E.E, Bauer P.M, Darley-Usmar V, Shiva S, Cifuentes-Pagano E, Freeman B.A, Gladwin M.T, Pagano P.J. (2011). Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: new concepts in reactive oxygen species signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, **51**, (7) 1271-1288.
- Albano S.M and Miguel M.G (2010). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Ind. Cro. Prod.*, 1-6.
- Alfonso-Prieto M, Biarnés X, Vidossich P, Rovira C. (2009). The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American chemical society*, **131**, (33) 11751-11761.
- Alinkumar M, Jibin J. (2007). Evaluation of *in vitro* anti-Inflammatory activity of the methanolic extract of *Litsea quinqueflora* (Dennst.) suresh. *J. Pharm. Biol. Sci.*, **10**, (2), 32-36.
- Alvarez-Suarez J.M , Giampieri F, González-Paramás A.M, Damiani E, Astolfi P, Martinez-Sanchez G, Bompadre S, Quiles J.L, Santos-Buelga C, Battino M. (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food Chem. Toxicol.*, **50** (5), 1508-1516.
- Andrade D, Gil C, Breitenfeld L, Domingues F, Duarte A.P. (2009). Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind. Crops Prod.*, **30**, 165-167.
- Arango Duque G, Descoteaux A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.*, **5**, 491.

- Arimboor R, Arumughan C. (2011) Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) proanthocyanidins inhibit *in vitro* enzymatic hydrolysis of protein. *J. Food Sci.*, **76**, (6) 130-137.
- Arnan X, Quevedo L, Rodrigo A. (2013). Forest fire occurrence increases the distribution of a scarce forest type in the Mediterranean Basin. *Acta Oecologica*, **46**, 39-47.
- Aruoma O.I. (1996). Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **73**, 1617-1625.
- Arzanlou M, Bohlooli S, Jannati E, Mirzanejad-Asl H. (2011). Allicin from garlic neutralizes the hemolytic activity of intra- and extracellular pneumolysin O *in vitro*. *Toxicon.*, **57**, 540-545.
- Ashcroft G.S, Lei K, Jin W, Longenecker G, Kulkarni A.B, Greenwell-Wild T, Hale-Donze H, McGrady G, Song X.Y, Wahl S.M. (2000). Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat. Med.*, **6**, 1147-1153.
- Aslan A, Güllüce M, Sökmen M, Adigüzel A, Sahin F, Özkan H. (2006) Antioxidant and antimicrobial properties of lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Everinia divaricata*, *Everinia prunastri* and *Neofuscella*. *J. Pharm. Biol.*, **44**, 247-252.
- Auddy B, Ferreira M, Blasina F, Lafon L, Arredondo F, Dajas F, Mukherjee B. (2003). Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *J. Ethnopharmacol.*, **84**, (2) 131-138.
- Autier J, Miyara M, Buyse S. (2004). Module 8: immunopathologie, réaction inflammatoire. item112, editor. Issy-les-Moulineaux: Estem, 192.
- Avila-Nava A, Calderón-Oliver M, Medina-Campos O.N, Zou T, Gu L, Torres N, Tovar A. R, Pedraza-Chaverri J. (2014). Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes scavenges reactive oxygen species *in vitro* and enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J. Func. Food*, **10**, 13-24.
- Ayaz, F.A., Kucukislamoglu, M., Reunanen, M. (2000). Sugar, non-volatile and phenolic acids composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L. var. *ellipsoidea*) fruits. *J. Food Compos. Anal.* **13**, 171-177.
- Bae Y.S, Kang S.W, Seo M.S, Baines I.C, Tekle E, Chock P.B, Rhee S.G. (1997). Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **272**, 217-221.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin J.C, Pinkas M, Luycky M and Gazin M (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, **46**, 1086-1089.
- Bala A, Haldar P.K. (2013). Free radical biology in cellular inflammation related to rheumatoid arthritis. *OA. Arthritis* **1** (2), 15.
- Balaban S, Nemoto S, Finkel T. (2005). Mitochondria, oxidants and aging. *Cell.*, **120**, 483-495.
- Ball G.F.M. (2006). Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability. *CRC Press, Boca Raton, ISBN 9781574448047*, 3-305.
- Banjarnahor S.D.S, Artanti N. (2014). Antioxidant properties of flavonoids. *Med. J. Indones.*, **23**, (4) 239-244.



- Baraut J, Farge D, Jean-Louis F, Kesmandt H, Durant C, Verrecchia F, Michel L. (2012). Les cytokines dans la sclérodémie systémique. *Pathol. Biol.* (Paris), **60**, 127-139.
- Barnes P.J. (1998). Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clinical Sci.*, **94**, 557-572.
- Barros L, Carvalho A.M, Morais J.S, Ferreira I.C.F.R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: detailed characterisation in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.*, **120**, 247-254.
- Barros L, Falcão S, Baptista P, Freire C, Vilas-Boas M, Ferreira I.C.F.R. (2008). Antioxidant activity of *Agaricus sp. mushrooms* by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.*, **111**, 61-66.
- Barton G.M. (2008). A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin Investig.*, **118**, (2) 413-420.
- Baudin B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *Mt. Cardio.*, **2**, (1) 43-52
- Beckman K.B, Ames B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.*, **78**, (2) 547-581.
- Belkner J, Wiesner R, Kuhn H, Lankin V.Z. (1991). The oxygenation of cholesterol esters by the reticulocyte lipoxigenase. *FEBS. Lett.*, **279**, 110-114.
- Bernstein N, Akram M, Daniyal M, Koltai H, Fridlender M, Gorelick J. (2018). Antiinflammatory potential of medicinal plants: a source for therapeutic secondary metabolites. *Adv. Agron.*, **150**, 131-183.
- Beta T, Nam S, Dexter J.E, Sapirstein H.D. (2005). Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions. *Cereal Chem.*, **82**, 390-393.
- Birben E, Sahiner U.M, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy Organ. J.*, **5**, (1) 9-19.
- Birklein F, Schmelz M. (2008). Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett*, **437**, 199-202.
- Black R.A, Rauch C.T, Kozlosky C.J, Peschon J.J, Slack J.L, Wolfson M.F, Castner B.J, Stocking K.L, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley K.A, Gerhart M, Davis R, Fitzner J.N, Johnson R.S, Paxton R.J, March C.J, Cerretti D.P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, **385**, 729-733.
- Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Ziyat A. (2002). Medicinal plants used in the treatment of diabetes in Morocco. *Int. J. Diabetes Metab.*, **10**, 33-50.
- Bnouham M, Merhfour F.Z, Legssyer A, Mekhfi H, Maâllem S, Ziyat A. (2007). Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. *Pharmazie*, **62**, 630-632.
- Bnouham M, Merhfour F.Z, Ziyat A, Aziz M, Legssyer A, Mekhfi H. (2010). Antidiabetic effect of some medicinal plants of Oriental Morocco in neonatal noninsulin-dependent diabetes mellitus rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, **29**, 865-871.
- Bonarska-Kujawa D, Pruchnik H, Oszmiański J, Sarapuk J, Kleszczyńska H. (2011). Changes caused by fruit extracts in the lipid phase of biological and model membranes. *Food biophys.*, **6**, (1) 58-67.

- Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H., Oszmiański, J., Sarapuk, J., & Kleszczyńska, H. (2011). Changes caused by fruit extracts in the lipid phase of biological and model membranes. *Food Biophys.*, **6** (1), 58-67.
- Bonnefont-Rousselot D, Théron P, Beaudeau J.L, Peynet J, Legrand A Delattre J. (2001). Vieillesse et stress oxydant. Quels marqueurs potentiels. *Ann. Biol. Clin.*, **59**, (4) 453-459.
- Borish L.C, Steinke J.W. (2003). Cytokines and chemokines. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **111**, 460-475.
- Borovikova L.V, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina G.I, Watkins L.R, Wang H, Abumrad N, Eaton J.W, Tracey K.J. (2000). Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nat. Med.*, **405**, 458-462.
- Börzsei R, Pozsgai G, Bagoly T, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Z. (2008). Inhibitory action of endomorphin-1 on sensory neuropeptide release and neurogenic inflammation in rats and mice. *Neurosci*, **152**, 82-88.
- Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem.*, **114**, 1198-1205.
- Bouhlali E.D.T., Alem C., Zegzouti Y.F. (2016). Antioxidant and anti-hemolytic activities of phenolic constituents of six moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) syrups. *BioTechnol.An Indian J.*, **12**(1), 45-52.
- Bradley J.R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.*, **214**, 149-160.
- Brandstätter H, Samer C.F, Ribic C, Piguet V. (2010). Reactions d'hypersensibilité Immédites aux anti-inflammatoires non stéroïdiens : allergie ou pseudo-allergie. *Rev. Med. Suisse*, **6**, 1345-1350.
- Bubols G.B, Vianna Dda V, Medina-Reimon A, von Poser G, Lamuela-Raventos R.M, Eifler-Búfalo M.C, Ferreira I, Costa G, Francisco V, Liberal J, Cruz M.T, Lopes M.C, Batista M.T, Sforcin J.M. (2013). Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- $\kappa$ B and MAPK activation in macrophages. *J. Ethnopharmacol.*, **149**, 84-92.
- Butler J, and Hoey B.M. (1993). The one-electron potential of several substrates can be related to their reduction rates by cytochrome-P-450 reductase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1161**, 73-78.
- Byrne A, Reen D.J. (2002). Lipopolysaccharide induces rapid production of IL-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J. Immunol.*, **168**, 1968-1977.
- Calder PC, (2006). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **75**, 197-202.
- Cantagrel A, Degboé Y, Constantin A, Davignon J.L. (2017). Le TNF- $\alpha$ , l'interleukine-6 et l'interleukine-1: trois cytokines centrales de la polyarthrite. *Rev. Rhum. Monogr.*, **84**, 325-330.
- Carcache-Blanco E.J, Cuendet M, Park E.J, Su B.N, Rivero-Cruz J.F, Farnsworth N.R, Pezzuto J.M, Douglas Kinghorn A. (2006). Potential cancer chemopreventive agents from *Arbutus unedo*. *Nat. Prod. Res.*, **20**, 327-334.
- Casas-Grajales S, Muriel P. (2015). Antioxidants in liver health. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.*, **6**, (3) 59-72.

- Cavin A., 1999. Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (annonacées), Thèse de Doctorat, Lausanne, 241.
- Celep E, Aydın A, Kırmızıbekmez H, Yesilada E. (2013). Appraisal of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity potential of *cornelian cherry* leaves. *Food. Chem. Toxicol.*, **62**, 448–455.
- Chang L.C, Song L.L, Park E.J, Luyengi L, Lee K.J, Farnsworth N.R, Pezzuto J.M, Kinghorn A.D. (2000). Bioactive constituents of *Thuja occidentalis*. *J. Nat. Prod.*, **63**, 1235-1238.
- Chang W.S, Lee Y.J, Lu F.J, Chiang H.C. (1993). Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer res.*, **13**, 2165-2170.
- Charles N.S, Peter A.W, Derek W.G. (2010). Fundamentals of Inflammation. *Cambridge University Press*, 2-3.
- Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta P.K (2007). Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* **41**, 42-48.
- Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zha L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.*, **9**, (6) 7204-7218.
- Chen L, HU J.Y, Wang S.Q. (2012). The rôle of antioxidants in photoprotection: a critical review. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **67**, (5) 1013-1024.
- Chen, P. S., Toribara, T. Y., and Warner, H. (1956) *Anal. Chem.*, **28**, 1756–1763.
- Cho S.Y, Park S.J, Kwon M.J, Jeong T.S, Bok S.H, Choi W.Y, Jeong W.I, Ryu S.Y, Do S.H, Lee C.S, Song J.C, Jeong K.S. (2003). Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol. Cell. Biochem.*, **243**, 153-160.
- Clarkson P.M, Thompson H.S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**, (2) 637-646.
- Comhair S.A.A, Erzurum S.C. (2002). Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **283**, 246-255.
- Cornara L, La Rocca A, Marsili S, Mariotti M.G. (2009). Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *J. Ethnopharmacol.*, **125**, 16-30.
- Corrado B, Marco T, Rocchina C, Matteo F, Luca A, Narcisa G, Mario D.T. (2009) Role of coxibs in the strategies for gastrointestinal protection in patients requiring chronic non-steroidal anti-inflammatory therapy. *Pharm. Res.*, **59**, 90-100.
- Cos P, Ying L, Calomme M, Hu J.P, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck A.J., Vanden Berghe D. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*, **61** (1), 71-76.
- Cruz-Topete D, Cidlowski J.A. (2015). One Hormone, Two Actions: Anti and Pro-Inflammatory Effects of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulat.*, **22**, 20-32.
- Çubukçu B, Suzgeç S. (1997). *Geleneksel Folklorik Droglar Dergisi*, **4**, 4.
- Cuendet M, Pezzuto J.M. (2000). The role of cyclooxygenase and lipoxygenase in cancer chemoprevention. *Drug Metabol. Drug. Interact.*, **17**, 109-157.
- Cuzzocrea S, Riley D.P, Caputi A.P, Salvemini D. (2001). Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacol. Rev.*, **53**, (1) 135-159.

- Dalto A, Matte J.J. (2017). Pyridoxine (Vitamin B6) and the Glutathione Peroxidase System; a Link between One-Carbon Metabolism and Antioxidation. *Nutrients*, **9**, (189) 1-13.
- Dangoumau J. (2006). Pharmacologie générale. Edition 2006 Département de pharmacologie. Université Victor Segalen Bordeaux 2. <http://www.scribd.com/doc/24947187/pharmacologie-generale>
- Das Sarma A, Mallick A, Ghosh A.K. (2010). Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. *Intern. J. Pharma. Sci. Res.*, **1**(3) 185-192.
- De Freitas M.V, Netto R.M, Da Costa Huss J.C, De Souza T.M.T, de Oliveira C.J, Firmino C.B, Penha-Silva N. (2008). Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. *Toxicol. in Vitro* **22**, 219-224
- Debnath P.C, Das A, Islam A, Islam M.A, Hassan M.M, Gias Uddin S.M. (2013). Membrane stabilization, A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of a Bangladeshi medicinal plant: *Erioglossum rubiginosum* (Bara Harina). *Phcog. J.*, **5**, 104-107.
- Dehmlow C, Erhard J, De Groot H. (1996). Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatol.*, **23** (4), 749-754.
- Dejean C, Richard D. (2013). Mécanismes d'action des glucocorticoïdes. *Rev. Méd. Interne*, **34**, 264-268.
- Delaporte R.H., Sarragiotto M.H., Takemura O.S., S´anchez G.M., Filho B.P.D., Nakamura C.V. (2004). Evaluation of the antioedematogenic, free radical scavenging and antimicrobial activities of aerial parts of *Tillandsia streptocarpa* Baker – Bromeliaceae. *J. Ethnopharmacol.*, **95**, 229-233.
- Deng S-L, Cheng W-F, Zhou B, Yang L. and Liu Z-L. (2006) Protective effect of curcumin and its analogues against free radical –induced oxidative haemolysis of human red blood cells. *Food Chem.*, **98**, 112-119.
- Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. (1996). Cytokines pro-inflammatoires et cellules phagocytaires. *Rev Fr Allergol*, **36**, 310-314.
- Devasagayam T.P.A, Tilak J.C, Boloor K.K, Sane K.S, Ghaskadbi S.S, Lele R.D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health : current status and future prospects. *Assoc. Physicians India*, **52**, 794-804.
- Devillier P. (2005). Effets synergiques et additifs entre les différentes classes d'anti inflammatoires de l'asthme. *Rev. fr. Allergol.*, **45**, 416-421.
- Dharmadeva S, Galgamuwa L.S, Prasadinie C and Kumarasinghe N. (2018). *In vitro* anti-inflammatory activity of *Ficus racemosa* L. bark using albumin denaturation method. *AYU*, **39** (4), 239-242.
- Dib M.A, Paolini J, Bendahou M, Varesi L, Allali H, Desjobert J.M, Tabti B, Costa J. (2010). Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves, stems and roots of *Arbutus unedo* and in vitro antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. *Nat. Prod. Commun.*, **5**, 1085-1090.
- Dib M.E.A, Allali H, Bendiabdellah A, Meliani N, Tabti B. (2013). Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *J. Saudi Chem. Soc.*, **17**, 381-385.
- Djipa C.D, Delmée M, Quetin-Leclercq J. (2000). Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol*, **71**, 307-313.

- Dorward D.A, Lucas C.D, Rossi A.G, Haslett C, Dhaliwal K. (2012). Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharm Ther*, **135**, 182-199.
- Droge W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.*, **82**, (1) 47-95.
- Dufour C, Loonis M, Dangles O. (2007). Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, (2) 241-252.
- Duganath N, Rubesh Kumar S, Kumanan R, Jayaveera K.N. (2010). Evaluation Of Anti-Denaturation Property And Anti-Oxidant Activity Of Traditionally Used Medicinal Plants. *J. Pharm. Bio. Sci.*, **1**, (2), 1-7.
- Durga M, Nathiya S, and Devasena T. (2014). Immunomodulatory and antioxidant actions of dietary flavonoids. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **6** (2), 50-56.
- Dussauze H, Bourgault I, Doleris L.M, Prinseau J, Baglin A, Hanslik T. (2007). Corticothérapie systémique et risque infectieux. *Rev. Méd. Interne*, **28**, 841-851.
- Duwiejua M, Zeitlin I.J, Waterman P.G, Chapman J, Mhango G.J, Provan G.J. (1993). Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family *Burseraceae*. *Planta Med.*, **59**, (1) 12-16.
- El Haouari M, L'opez J.A, Mekhfi H, Rosado J.J, Salido G.M. (2007). Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *J. Ethnopharmacol.*, **113**, 325-331
- El ouarti A., Cherif Haouat A., Sqalli H., Hggoud A., Ennabili A., Ibsouda S., Mohamed, Lachgar M., , Iraqui M. (2012). Extra- and intracellular antimycobacterial activity of *Arbutus unedo* L. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **6**, 1283-1290.
- El-Hilaly J, Hmammouchi M, Lyoussi B. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *J. Ethnopharmacol.*, **86**, 149-158.
- Ellman G. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, (1) 70-77.
- El-Shabrany O.A, El-Gindi O.D, Melek F.R, Abdel-Khalk S.M, Haggig M.M. (1997). Biological properties of saponin mixtures of *Fagonia cretica* and *Fagonia mollis*. *Fitotherapy*; LXVIII, 219-222.
- Eming S.A, Krieg T, Davidson J.M. (2007). Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 514-525.
- Esquenazi D, Wigg M.D, Miranda M.M.F.S, Rodrigues H.M, Tostes J.B.F, Rozental S, Da Silva A.J.R, Alviano C.S. (2002). Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Res. Microbiol*, **153**, 647-652.
- Eteraf-Oskouei T, Allahyari S, Akbarzadeh-Atashkhosrow A, Delazar A, Pashaii M, Gan S.H, Najafi M. (2015). Methanolic extract of *Ficus carica* Linn. Leaves exerts antiangiogenesis effects based on the rat air pouch model of inflammation. *Evid. Based. Complement Alternat. Med.*, **760405**, 1-9.
- Evans W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Clin. Nutr.*, **72**, 647-652.
- Farahpour H, Habibi M. (2008). Evaluation of the wound healing activity of an ethanolic extract of *Ceylon cinnamon* in mice. *Vet. Med.*, **57**, (1) 1-5.

- Fauve R.M, Hevin M. (1998). Reaction inflammatoire et reactions immunitaires. *Inflammation*. Russo-Marie F, Peltier A, Polla B S. John Libbey Eurotext (France), 10-19.
- Favier A. (2003). Le stress oxydant. *L'Act. Chim.*, 108-115.
- Fechtner S, Singh A, Chourasia M, Ahmed S. (2017). Molecular insights into the differences in anti-inflammatory activities of green tea catechins on IL1 $\beta$  signaling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **329**, 112-120.
- Ferreria A, Proenca C, Serralheiro M.L.M, Araujo M.E.M. (2006). The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from portugal. *J. Ethnopharmacol.*, **108**, 31-37.
- Fiorentino A, Castaldi S, D'Abrosca B, Natale A, Carfora A, Messere A, Monaco P. (2007). Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland. *Biochem. Syst. Ecol.*, **35**, 809-811.
- Fisher-Wellman K, Bloomer R.J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: A 30 year history. *Dyn. Med.*, **8**, 1-25.
- Fiske, C.H, and Subbarow, I.P. (1925) *J. Biol. Chem.*, **66**, 375-379.
- Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, **6**, 232-241.
- Girard A, Madani S, Boukourt F, Cherkaoui-Malki M, Belleville J. and Prost J. (2006) Fructose-enriched diet modifies antioxidant status and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Nutr.*, **22**, 758-766.
- Goel A, Dani V, Dhawan D.K. (2005). Protective effects of zinc on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and hepatic histoarchitecture in chlorpyrifos induced toxicity. *Chem. Biol. Interact.*, **156**, 131-140.
- Goldsby R, Kindt T.J. Osborne B.A. (2001). *Immunologie*, 4 $\text{\u00e8}$ me \u00e9d. Dunod, Paris.
- Gomes F, Canhoto J.M. (2009). Micropropagation of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) from adult plants. *Cell. Dev. Biol. Plant.*, **45**, 72-82.
- Gomes M.F.F.N. (2011). Strategies for the Improvement of *Arbutus unedo* L. (Strawberry Tree): In vitro Propagation, Mycorrhization and Diversity Analysis. Universidade de Coimbra.
- Gonz\u00e1lez J.A, Garc\u00eda-Barriuso M, Amich F. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. *J. Ethnopharmacol.*, **131**, 343-355.
- Gornall A, Charles G, Bardawill J, Maxima MD. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, **177**, 751-766.
- Goto S, Radak Z. (2013). Implication of oxidative damage to proteins and DNA in aging and its intervention by caloric restriction and exercise. *J. sport health Sci.*, **2**, 75-80.
- Goulart I.M, Mineo J.R, Foss N.T. (2000). Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, **122**, 330-334.
- Guimar\u00e3es R, Barros L, Calhella R.C, Carvalho A.M, Queiroz M.J.R.P, Ferreira I.C.F.R. (2014). Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from northeastern Portugal: a comparative study. *Plant. Foods Hum. Nutr.*, **69**, 37-42.

- Gülçin I and Beydemir S. (2013). Phenolic Compounds as Antioxidants: Carbonic Anhydrase Isoenzymes Inhibitors. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **13**, 408-430.
- Gülçin I, Alici H.A, Cesur M. (2005). Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, (3) 281-285.
- Gülçin I, Huyut Z, Elmastas M, Aboul-Enein H.Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian J. Chem.*, **3**, (1), 43-53.
- Gülçin I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch. Toxicol.*, **86**, (3) 345-391.
- Gutowski M, Kowalczyk S. (2013). A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. *Acta. Biochem. Pol.*, **60**, (1) 1-16.
- Guzman Tirado M.A. (1997). Aproximación a la etnobotánica de la provincia de Jaén. Ph.D. dissertation. Granada: Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Granada, España.
- Hale A.L. (2003). Screening potato genotypes for antioxidant, identification of the responsible compounds, and differentiating Russet Norkotah Strains using aflp and microsatellite marker analysis. *Office of Graduate Studies of Texas A&M University*, 260.
- Haleng J, Pincemail J, Defraigne J. O., Charlier C., J.P. Chapelle J.P. (2007). Le stress oxydant. *Rev. Med. Liege*, **62**(10) 628-638.
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr. Rev.*, **52**, 253-265.
- Halliwell B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.*, **31**, (4) 261-272.
- Halliwell B. (2001). Role of free radicals in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drug Aging.*, **18**, 685-716.
- Hamden K, Ayadi F, Jamoussi K, Masmoudi H, Elfeki A. (2008). Therapeutic effect of phytoecdysteroids rich extract from *Ajuga iva* on alloxan induced diabetic rats liver, kidney and pancreas. *BioFactors*, **33**(3), 165-175.
- Headland S.E, Norling L.V. (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin. Immunol.*, **27** (3), 149-160.
- Heijnen C.G, Haenen G.R, van Acker F.A, van der Vijgh W.J, Bast A. (2001). Flavonoids as peroxynitrite scavengers : the role of the hydroxyl groups. *Toxicol. in vitro*, **15** (1) 3-6.
- Hellsten Y, Svensson M, Sjödin B, Smith S, Christensen A, Richter E.A, Bangsbo J. (2001). Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise. *Free Radic. Biol. Med.*, **31** (11) 1313-1322.
- Henneberg R, Michel Fleith Otuki M.F, Emmer Ferreira Furman A, Priscila Hermann P, Nascimento A.J.D, Soares Leonart M.S. (2013). Protective effect of flavonoids against reactive oxygen species production in sickle cell anemia patients treated with hydroxyurea. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, **35** (1), 52-55.
- Henrotin Y, Deby-Dupont G, Reginster J.Y. (2001). Les médiateurs biochimiques de l'inflammation. *Rev. Med. Liege*, **56**, 433-442.
- Ho Y.S, Lai C.S, Liu H.I, Ho S.Y, Tai C, Pan M.H, Wang Y.J. (2007). Dihydrolipoic acid inhibits skin tumor promotion through anti-inflammation and anti-oxidation. *Biochem. Pharmacol.*, **73**, 1786-1795.

- Holbrook NJ, Ikeyama S. (2002). Age-related decline in cellular response to oxidative stress: links to growth factor signaling pathways with common defects. *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 999-1005.
- Hong J.R, Lin G.H, Lin C.G, Wang W.P, Lee C.C, Lin T.L, Wu J.L. (2002). Phosphatidylserine receptor is required for the engulfment of dead apoptotic cells and for normal embryonic development in zebrafish. *Development*, **131** (21) 5417-5427.
- Howcroft T.K, Campisi J, Louis G.B, Smith M.T, Wise B, Wyss-Coray T, Augustine A.D, Mcelhaney J.E, Kohanski R, Sierra F. (2013). The role of inflammation in aged-related disease. *Aging* (Albany N.Y.), **5** (1), 84-93.
- Huang D. (2018). Dietary Antioxidants and Health Promotion. *Antioxidants (Basel)*, **7**, (1) 1-9.
- Huo H.Z, Wang B, Liang Y.K, Bao Y.Y, Gu Y. (2011). Hepatoprotective and antioxidant effects of licorice extract against CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage in rats. *Int. J. Mol. Sci.*, **12**, (10) 6529-6543.
- Hurd T.R, DeGennaro M, Lehmann R. (2012). Redox regulation of cell migration and adhesion. *Trends. Cell. Biol.*, **22**, 107-115.
- Hurtado-Nedelec M, Dang P.M.C, Monteiro R.C, El Bennab J, Gougerot-Pocidaloa M.A. (2014). Physiologie des polynucléaires neutrophiles humains. *Rev. Francoph. des Lab.*, **2014**, 25-38.
- Hurtado-Nedelec M, Dang P.M.C, Monteiro R.C, El Bennab J, Gougerot-Pocidaloa M.A. (2014). Physiologie des polynucléaires neutrophiles humains. *R F L*, **2014**, 25-38.
- 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. Longev.*, **2016**, 1-9.
- Inbathamizh L, Mekalai Ponnu T, Jancy Mary E. (2013). In vitro evaluation of antioxidant and anticancer potential of *Morinda pubescens* synthesized silver nanoparticles. *J. Pharm. Res.*, **6**, 32-38.
- Iwalewa E.O, McGaw L.J, Naidoo V, Eloff G.N. (2007). Inflammation: The foundation of of diseases and disorders: a review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *Afr. J. Biotechnol.*, **6** (25) 2868-2885.
- Janeway C.A, Travers P, Walport M, Shlomchik M.J. (2003). Immunobiologie. Le système immunitaire fondamental et pathologique. *2<sup>ème</sup> Edition, De Boeck Bruxelles* p. 42.
- Jayasena T, Poljak A, Smythe G, Braidy N, Münch G, Sachdev P. (2013). The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's Disease. *Ageing. Res. Rev.*, **12**, 867-883.
- Jiang M.Z, Yan H, Wen Y, Li X.M. (2011). In vitro and in vivo studies of antioxidant activities of flavonoids from *Adiantum capillus-veneris* L. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, **5** (18) 2079-2085.
- Johnson R.J, Sautin Y.Y, Oliver W.J, Roncal C, Mu W, Gabriela S.L, Rodriguez-Iturbe B, Nakagawa T, Benner S.A. (2009). Lessons from comparative physiology: could uric acid represent a physiologic alarm signal gone awry in western society. *J. Comp. Physiol. B.*, **179** (1) 67-76.
- Jones W.P and Kinghorn A.D (2005). Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker S D, Latif Z and Gray A I. Natural products isolation. *Humana Press* (Totowa), 323-411.



- Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M. (2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J. Ethnopharmacol.*, **77**, 175-182.
- Kardeh S, Ashkani-Esfahani S, Alizadeh A.M. (2014). Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer. *Eur. J. Pharmacol.*, **735**, 150-168.
- Kardum N, Takić M, Šavikin K, Zec M, Zdunić G, Spasić S and Konić-Ristić A. (2014). Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. *J. Funct. foods*, **9**, 89-97.
- Kaushik P, Kaushik D, and Khokra S.L. (2011). In vivo antioxidant activity of plant *Abutilon indicum*. *J. Pharm. Educ. Res.*, **2** (1), 50-53.
- Kehrer J.P, Klotz L-O. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease : implications for health. *Crit. Rev. Tox.*, **45** (9), 765-798.
- Kernouf N, Bouriche H, Kada S, Messaoudi D, Assaf A.M, Senator A. (2018). Anti-inflammatory and Immuno-modulatory Effects of *Capparis spinosa* Flower Bud Extract. *Ann. Res. Rev. Biol.*, **25** (3), 1-11.
- Keser S, Celik S, Turkoglu S, Yilmaz Ö and Turkoglu I. (2012). Hydrogen Peroxide Radical Scavenging and Total Antioxidant Activity of Hawthorn. *Chem. J.*, **2** (1), 9-12.
- Khan I, Yousif A.M, Johnson S.K, and Gamlath S. (2015). Acute effect of sorghum flourcontaining pasta on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and oxidative stress markers in healthy subjects: A randomised controlled trial. *Clin. Nutr.*, **34**(3), 415-421.
- Khoddami A, Wilkes M.A, Roberts T.H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, **18**, 2328-2375.
- Kim H.K, Namgoong S.Y, Kim H.P. (1993).Antiinflammatory Activity of Flavonoids:Mouse Ear Edema Inhibition. *Arch. Pharm. Res.*, **16**, 18-24.
- Kim M.S, Yi J.M, Kim S.H, Hong S.H, Kim H.M. (2004). Madimadi, Korean folk medicine, blocks TNF-a, IL-1b, and IL-8 production by activated human immune cells. *Cytokines*, **25**, 179-186.
- Kivcak B, Mert T, Demirci B, and Baser K.H.C., (2001). Composition of the essential oil of *Arbutus unedo*.*Chem. Nat. Comp.*, **37**(5), 445-446.
- Kivçak B, Mert T, Ertaçlar H, Balçioğlu I.C, Ozensoy Töz, S. (2009). In vitro activity of *Arbutus unedo* against *Leishmania tropica* promastigotes. *Acta Parasitol. Turc*, **33**, 114-115.
- Kıvçak B, Mert T. (2001). Quantitative determination of  $\alpha$ -tocopherol in *Arbutus unedo* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoter.* **72**, 656-661.
- Koehlin-Ramonatxo C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr. Clin. Métab.*, **20**, (4) 165-177.
- Koren H.S. (1995). Association between criteria air pollutants and asthma. *Environ. Health. Perspect.*, **103**, 235-242.
- Krishna M, Upendra K. (2012). Enhancement of wound healing with roots of *Ficus racemosa* L. in albino rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, **2**, 276-80.
- Kumar S, Pandey A.K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.*, **2013**, Article ID 162750, 16 pages.

- Kumar V, Abul K.A, Nelson F, Richard M. (2007). Robbins Basic Pathology. 8th Edition, Elsevier, Philadelphia, 20-60.
- Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T, Nakayama T. (2002). Studies of the constituents of *Uruguayan propolis*. *J. Agr. Food Chem.*, **50**, 4777-4782.
- Kunwar A, Mishra B, Barik A, Kumbhare L.B, Pandey R, Jain V.K. and Priyadarsini K.I. (2007). 3,3-Diselenodipropionic acid, an efficient peroxy radical scavenger and a GPx mimic, protects erythrocytes (RBCs) from AAPH-induced hemolysis. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1482-1487.
- Kusano C, Ferrari B. (2008). Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *J. Cell Mol. Biol.*, **7**, (1) 1-15.
- Lahmidani N, Mellouki I, El Yousfi M, Aqodad N, El Abkari M, Ibrahim A, Benajah D. (2012). L'ulcère bulbaire hémorragique et les anti-inflammatoires non stéroïdiens: quelle gravité de l'accident hémorragique Bleeding peptic ulcer and Non steroidal Anti Inflammatory Drugs: what severity of bleeding. *J. Afr. Hépatol. Gastroentérol.*, **6**, 193-195.
- Landis G.N, Tower J. (2005). Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech. Ageing. Dev.*, **126**, 365-79.
- Lattanzio V. (2013). Phenolic compounds : Introduction. *Nat. Prod.*, 1543-1580.
- Lavanya R, Maheshwari S.U, Harish G, Raj J.B, Kamali S, Hemamalani D, Varma J.B, Reddy C.U. (2010). Investigation of in-vitro anti-inflammatory, anti-platelet and anti-arthritis activities in the leaves of *Anisomeles malabarica* Linn. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, **1** (4) 746-752.
- Laveti D, Kumar M, Hemalatha R, Sistla R, Naidu V.G, Talla V, Verma V, Kaur N, Nagpal R. (2013). Anti-inflammatory treatments for chronic diseases: a review. *Inflamm. Allerg. Drug. Targets.*, **12** (5) 349-361.
- Lavie L. (2015). Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia—revisited—the bad ugly and good: implications to the heart and brain. *Sleep Med. Rev.*, **20**, 27-45.
- Le K, Chiu F and Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chem.*, **105**, 353-363.
- Lee D-S., Woo J-Y., Ahn C-B., Je J-Y. (2014). Chitosan–hydroxycinnamic acid conjugates: Preparation, antioxidant and antimicrobial activity. *Food Chem.* **148**, 97-104
- Lee H.N, Surh Y.J. (2012). Therapeutic potential of resolvins in the prevention and treatment of inflammatory disorders. *Biochem. Pharmacol.*, **84**, 1340-1350.
- Lee S.J, Kun H.S, Hyeun W.C, Iae C.D, Keun Y.J, Sam S.K, Hyun P.K. (1993). Antiinflammatory Activity of Naturally Occurring Flavone and Flavonol Glycosides. *Arch. Pharm. Res.*, **16**, (1), 25-28.
- Legssyer A, Ziyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Herrenknecht C, Roumy V, Fourneau C, Laurens A, Hoerter J, Fischmeister R. (2004). Tannins and catechin gallate mediate the vasorelaxant effect of *Arbutus unedo* on the rat isolated aorta. *Phyther. Res.*, **18**, 889-894.
- Leonti M, Casu L, Sanna F, Bonsignore L. (2009). A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily-De Materia Medica revisited?. *J. Ethnopharmacol.*, **121**, 255-267.
- Lesgards J.F, Durand P, Lassarre M, Stocker P, Lesgards G, Lanteaume A, Prost M, Lehucher-Michel M.P. (2002). Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 479-486.

- Lévy P, Fanello S, Pivette J, Parot-Schinkel E, Le Grand G, Schoux J.B, Le Bodo P. (2005). Anti-inflammatoires non stéroïdiens et risques iatrogènes potentiels: analyse des données de l'Assurance maladie. *Revue Médicale de l'Assurance Maladie*, **32** (2), 153-161.
- Li H, Tsao R, Deng Z. (2012). Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods. *Can. J. Plant. Sci.*, **92**, 1101-1111.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F and Jiang Y (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem*, **102**, 771-776.
- Li J, Holbrook N.J. (2003). Common mechanisms for declines in oxidative stress tolerance and proliferation with aging. *Free Radic. Biol. Med.*, **35**, 292-299.
- Libby P. (2007). Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr. Rev.*, **65** (12) 140-146.
- Liu W, Liu J, Yin D, Zhao X. (2015). Influence of Ecological Factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. *PLOS One*, **10** (4), 1-22.
- Liyana-Pathirana C.M, Shahidi F. (2006) Antioxydant proprieties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum* L.) and their milling fractions. *J. Sci. Food Agr.*, **86**, 477-485.
- Liz R, Pereira D.F., Horst H, Dalmarco E.M., Dalmarco J.B., Simionatto E.L., Pizzolatti M.G., Girard D, Fröde T.S. (2011). Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model. *Int. Immunopharmacol.*, **11**, 1991-1999.
- Lloyd M.M, Grima M.A, Rayner B.S, Hadfield K.A, Davies M.J, Hawkins C.L. (2013). Comparative reactivity of the myeloperoxidase-derived oxidants hypochlorous acid and hypothiocyanous acid with human coronary artery endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **65**, 1352-1362.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.*, **4** (8) 118-126.
- Loo AY, Jain K, Darah I. (2008). Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food Chem.*, **107**, 1151-1160.
- Lowe D.B, Storkus W.J. (2011). Chronic inflammation and immunologic-based constraints in malignant disease. *Immunotherapy*, **3**, (10) 1265-1274.
- Lyn Patrick N.D. (2006). Lead Toxicity Part II: The Role of Free Radical Damage and the Use of Antioxidants in the Pathology and Treatment of Lead Toxicity. *Altern. Med. Rev.*, **11**, (2) 114-127.
- Maiani G, Periago Castón M.J, Catasta G, Toti E, Cambrodón I.G, Bysted A, Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Knuthsen P, Valoti M, Böhm V. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nut. Food Res.*, **53**, 194-S218.
- Majdalawieh A.F, Fayyad M.W. (2015). Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. *Int. Immunopharmacol.*, **28**, 295-304.

- Males Z, Plazibat M, Vundać V.B, Zuntar I. (2006). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree *Arbutus unedo* L. (Ericaceae). *Acta. Pharmaceutica.*, **56**, 245-250.
- Maleš Ž, Šarić D, Bojić M. (2013). Quantitative determination of flavonoids and chlorogenic acid in the leaves of *Arbutus unedo* L. using thin layer chromatography. *J. Anal. Methods Chem.* **2013**. Article ID 385473, 4 pages.
- Manga H.M, Brkic D, Marie D.E.P, Quetin-Leclercq J (2004). In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Mull. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*, **92**, 209-214.
- Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau A.S, Richard M.J, Favier A. (2003). Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise- induced antioxidant response. *J. Am. Coll. Nutr.*, **22**, (2) 147-156.
- Mariotto S, Ciampa A.R, de Prati A.C, Darra E, Vincenzi S, Segal M, Cavaliere E, Shoji K, Suzuki H. (2008)b. Aqueous extract of *Arbutus unedo* inhibits STAT1 activation in human breast cancer cell line MDA-MB-231 and human fibroblasts through SHP2 activation. *Med. Chem.*, **4**, 219-228.
- Mariotto S., Esposito E., Di Paola R., Ciampa A., Mazzon E., de Prati A.C., Darra E., Vincenzi S., Cucinotta G., Caminiti R., Suzuki H., Cuzzocrea S. (2008)a. A Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenan-induced lung inflammation in mice. *Pharmacol. Res.*, **57**, 110-124.
- Marklund S, Marklund G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469-474.
- Marston A, Hostettmann K (2006). Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications , Edited by Oyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham, published by Taylor and Francis Group, ISBN:0-8493-2021-6 , 1-36.
- Martindale J.L, Holbrook N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.*, **192**, 1-15.
- Martinez-Cayuela M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, **77** (3), 147-161.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, **16**, (10) 577-586.
- Medzhitov R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, **454**, 428-435.
- Mekhfi H, El Haouari M, Bnouham M, Aziz M, Ziyyat A, Legssyer A. (2006). Effects of Extracts and Tannins from *Arbutus unedo* Leaves on Rat Platelet Aggregation. *Phytother. Res.*, **20**, 135-139.
- Mekhfi H, El Haouari M, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M, Atmani F, Remmal A, Ziyyat A. (2004). Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **94**, 317-322.
- Mena S, Ortega A, Estrela J.M. (2009) Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, **674**, (1-2) 36-44.

- Mendes L, De Freitas V, Baptista P, Carvalho M. (2011). Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chem. Toxicol.*, **49**, 2285-2291.
- Mhamdi Takrouni M, Ben El Haj Ali I, Messaoued C, Boussaid M. (2012). Genetic variability of Tunisian wild strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) populations interfered from isozyme markers. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, **146**, 92-98.
- Michel Y.F, Lin Z.X, Xin Y.X, Zi R, Jian N.C, Xiao P.L, Siu P. (2012). Effect of *Rhizoma Polygonati* on 12-O-tetradecanoylphorbol-acetate-induced ear edema in mice. *J. Ethnopharmacol.*, **142**, 851-856.
- Middleton E.J.R, Kandaswami C, Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 673-751.
- Mihara M, Uchiyama M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, **86**, 271-278.
- Minghetti L, Polazzi E, Nicolini A, Levi G. (1998). Opposite regulation of prostaglandin E2 synthesis by transforming growth factor-beta1 and interleukin 10 in activated microglial cultures. *J. Neuroimmunol.*, **82**, 31-39.
- Mitjavila M.T, and Moreno J.J. (2012). The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochem. Pharmacol.*, **84** (9), 1113-1122.
- Mohammed M.S, Osman W.J.A, Garelnabi E.A.E, Osman Z, Osman B, Khalid H.S, Mohamed M.A. (2014). Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. *J. Phytopharmacol.*, **3**, (4) 275-285.
- Morgado S, Morgado M, Plácido A.I, Roque F, Duarte A.P. (2018), *Arbutus unedo* L.: From traditional medicine to potential uses in modern Pharmacotherapy. *J. Ethnopharmacol.*, **225**, 90-102.
- Morgan M.J, Liu Z.G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell. Res.*, **21**, 103-115.
- Mosquera O.M, Correa Y.M, Buitrago D.C, Nino J. (2007). Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **102**, 631-634.
- Moure A, Cruz J.M, Franco D, Dominguez J.M, Sineiro J, Dominguez H, Nunez M.J, Parajo J.C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.*, **72**, 145-171.
- Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka Y, Fukuda Y. (2006). Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 1331-1336.
- Nagar A, Sharma V, Chhipa A.S. (2017). Role of antioxidants in biological system mintage. *J. Pharm. Med. Sci.*, **6**, 7-12.
- Nagulendran K.R, Velavan S, Mahesh R and Hazeena Begum V. (2007). In Vitro Antioxidant Activity and Total Polyphenolic Content of *Cyperus rotundus* Rhizomes. *E-J. Chem.*, **4** (3), 440-449.
- Naidu M.M, Shyamala B.N, Naik P.J, Sulochanamma G, Srinivas P. (2011). Chemical composition and antioxidant Activity of husk and endosperm of fenugreek seeds. *Food Sci. Technol.*, **44**, (2) 451-456.

- Nakayama S, Kishimoto Y, Saita E, Sugihara N, Toyozaki M, Taguchi C, Tani M, Kamiya T, & Kondo K. (2015). Pine bark extract prevents low-density lipoprotein oxidation and regulates monocytic expression of antioxidant enzymes. *Nutr. Res.*, **35** (1), 56-64.
- Nasir A, Abubakar M.G, Shehu R.A, Aliyu U, Toge B.K. (2013). Hepatoprotective effect of the aqueous leaf extract of *Andrographis paniculata* Nees against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Nig J. Basic Appl sci.*, **21**, (1) 45-54.
- Nema R.K, Manda S, Yadav S, Yadav S. (2009). Antioxidants: A Review. *J.Chem.Pharm. Res.*, **1**, (1)102-104.
- Nicolaou A, Pilkington S.M, Rhodes L.E. (2011). Ultraviolet-radiation induced skin inflammation: dissecting the role of bioactive lipids. *Chem. Phys. Lipids*, **164**, 535-543.
- Nijveldt R.J, Van Nood E, Van Hoorn D.E.C, Boelens P.G, Van Norren K, Van Leeuwen P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, **74**, 418-425.
- Niki E, Komuro E, Takahashi M, Urano S, Ito E, Terao K. (1988) Oxidative hemolysis of erythrocytes and its inhibition by free radical scavengers. *J. Biol. Chem.*, **263**, 19809-19814.
- Noack M, Kolopp-Sarda M.N. (2018). Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Rev. Fr. Lab.*, **489** (3), 28-37.
- Nordberg J, Arnér E.S.J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Rad. Biol. Med.*, **31**, 1287-1312.
- Novais M.H, Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *J. Ethnopharmacol.*, **93**, 183-195.
- Ocaña-Fuentes A, Arranz-Gutiérrez E, Señorans F.J, Reglero G. (2010). Supercritical fluid extraction of oregano (*Origanum vulgare*) essentials oils: anti-inflammatory properties based on cytokine response on THP-1 macrophages. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 1568-1575.
- Oliveira I, Baptista P, Malheiro R, Casal S, Bento A, Pereira J.A. (2011). Influence of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruit ripening stage on chemical composition and antioxidant activity. *Food Res. Int.*, **44**, 1401-1407.
- Oliveira R.B, Chagas-Paula D.A, Secatto A, et al. (2013). Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **23**, 497-505
- Oliveras-López M.J, Berná G, Jurado-Ruiz E, De la Serrana H.L.G, and Martín F. (2014). Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults. *J. Funct. foods*, **10**, 475-484.
- Orak H.H, Yagar H, Isbilir S.S, Demirci A.Ş, Gümüş T, Ekinçi N. (2011). Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf. *Food Sci. Biotechnol.*, **20**, 1249-1256.
- Oyedapo O.J, Ekundayo O, Koenig, W.A. (2004). Leaf volatile oil constituents of *Lantana camara* L. from Nigeria. *Flav. Fragr. J.*, **18**, 384-386.
- Özcan M.M, Hacisferogullan H. (2007). The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: chemical composition, physical properties and mineral contents. *J. Food Eng.*, **78**, 1022-1028.
- Ozsoy N, Can A, Yanardag R, Akev N. (2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chem.*, **110**, 571-583.
- Pabuçcuoğlu, A., Kivçak, B., Baş, M., Mert, T. (2003). Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves. *Fitoter.*, **74**, 597-599.

- Pallauf K, Rivas-Gonzalo J.C, del Castillo M.D, Cano M.P, de Pascual-Teresa S. (2008). Characterization of the antioxidant composition of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits. *J. Food Compost Anal.*, **21**, 273-281.
- Parikh B, Patel V.H. (2017). Quantification of phenolic compounds and antioxidant capacity of an underutilized Indian fruit: Rayan [*Manilkara hexandra* (Roxb.) Dubard]. *Food Sci. Human Welln.*, **6** (1), 10-19.
- Park M.H, Kim D.H, Lee E.K, Kim N.D, Im D.S, Lee J, Yu B.P, Chung H.Y (2014). Age-related inflammation and insulin resistance: a review of their intricate interdependency. *Arch. Pharm. Res.*, **37**, 1507-1514.
- Park P.J, Jung W.K, Nam K.S, Shahidi F, Kim S.K. (2001) Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *J. Am. oil Chem. Soc.*, **78**, (6) 651-656.
- Pham-Huy LA, Hua He H, Pham-Huy C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.*, **4**, (2) 89-96.
- Phaniendra A, Jestadi D.B, Periyasamy L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian. J. Clin. Biochem.*, **30**, 11-26.
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, **63**, (7) 1035-1042.
- Pincemail J, Bonjean K, Cayeux K, Defraigne J.O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr. Clin. Metab.*, **16** (4) 233-239.
- Pincemail J, Degrune F, Voussure S, Malherbe C, Paquot N and Defraigne J.O. (2007). Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutr. Clin. Metab.*, **21** (2), 66-75.
- Pincemail J, Meurisse M, Limet R, Defraigne J.O. (1998). Fumée de cigarette: une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. *Medi. Sphere*, **78**, 37-39.
- Pisoschi A.M, Pop A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.*, **97**, 55-74.
- Popovici C, Saykova I, Tylkowski B. (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre. *Rev. Gen. Indus.*, **4**, 25-39.
- Prasad K.N, Xie H, Hao J, Yang B, Qiu S, Wei X, Chen F, Jiang Y. (2010). Antioxidant and anticancer activities of 8-hydroxy-psoralen isolated from wampee [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] peel. *Food Chem.*, **118**, 62-66.
- Prieto P, Pineda M, and Aguilar M. (1999). Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E1. *Anal. Biochem.*, **269**, (2), 337-341
- Priyadharshini SD, Sujatha V. (2012). Antioxidant assessment for various solvent fractions of *Cassia fistula* Linn. flowers", *Int. J. PharmTech Res.*, **4** (1), 510-517.
- Psotová J, Lasovský J, Vicar J. (2003). Metal-chelating properties, electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics. *Biomed. Pap.*, **147**, 147-153.
- Qian F, Pang H.I, Xu X.R, Zou Z.Y, Dong P.C, Xiao X, Wang X, Sun T.T, Dou H.L, Lin X.M. (2012). Effect of lutein and zeaxanthin on macular pigment and visual function in patients with early age related macular degeneration. *Ophthalmology*, **119**, 2290-2297.
- Que F, Mao L and Pan X (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res Int*, **39**, 581-587.

- Quinones M, Miguel M, Aleixandre A. (2013). Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol. Res.*, **68**, (1) 125-131.
- Raedschelders K, Ansley D.M, Chen D.D.Y. (2012). The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol. Ther.*, **133**, 230-255.
- Rahman K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin. Interv. Aging*, **2**, (2) 219-236.
- Rao A.V, Rao L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacol. Res.*, **55**, (3) 207-216.
- Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. (2009). Mechanism of action of flavonoids as antiinflammatory agents: a review. *Inflamm. Allergy-Drug Targets*, **8**, 229-235.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 1231-1237.
- Rebaya A, Igueld Belghith S, Cherif J.k, Trabelsi-Ayadi M. (2016). Total Phenolic Compounds and Antioxidant Potential of Rokrose (*Cistus salviifolius*) Leaves and Flowers Grown in Tunisia. *In. J. Pharm. Phytochem. Res.*, **8**(2), 327-331.
- Rodrigo R, Miranda A, Vergara L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin. Chim. Acta*, **412**, 410-424.
- Rohit Y, Saurabh R, Ajay S (2012). Review On Antioxidants Activity And Its Evaluation. *J Pharma Res*, **1** (2), 41-58.
- Ruiz-Rodríguez B.M, Morales P, Fernández-Ruiz V, Sánchez-Mata M.C, Cámara M, Díez-Marqués C, Pardo-de-Santayana M, Molina M, Tardío J. (2011). Valorization of wild strawberry-tree fruits (*Arbutus unedo* L.) through nutritional assessment and natural production data. *Food Res. Int.*, **44**, 1244-1253.
- Saad A.F, Virella G, Chassereau C, Boackle R.J, LopesVirella M.F. (2006). OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J. Lipid Res*, **47**, 1975-1983.
- Sahreen S, Khan M.R and Khan R.A. (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chem.*, **122**, 1205-1211.
- Saibabu V, Fatima Z, Khan L.A, Hameed S. (2015). Therapeutic potential of dietary phenolic acids. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2015**, Article ID 823539, 10 pages.
- Saito H, Shimizu H, Mita H, Maeda Y, Akiyama K. (1996). Histamine augments VCAM-1 expression on IL-4 and TNF-alpha-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, **111**, 126-32.
- Sánchez A, Calpena A.C, Clares B. (2015). Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 16981-17004.
- Sánchez-Moreno. (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Sci. Technol. Int.*, **8** (3), 121-137.
- Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusko J.K. (2008). Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, **14**, 4280-4288.
- Sandhar H.K, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Int. Pharm. Sci.*, **1** (1) 25-41.



- Sangeetha M, Kousalya K, Lavanya R, Cherukuru S, Chamundeeswari D, Uma Maheswara R. (2011). *In-vitro* Anti-inflammatory and Anti-arthritis Activity of Leaves of *Cleodendron Inerme*. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, **2** (1) 822-827.
- Saraiva M, O'Garra A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 170-81.
- Saran M, Beck-Speier I, Fellerhoff B, Bauer G. (1999). Phagocytic killing of microorganisms by radical processes: consequences of the reaction of hydroxyl radicals with chloride yielding chlorine atoms. *Free. Radic. Biol. Med.*, **26**, 482-490.
- Sasikumar D, Mathi S, Awdah Masoud A.H, Ramesh T. (2012) Physiological and beneficial role of *Nelumbo nucifera* on hypercholesterolemia in rats exposed to cigarette smoke. *J. Pharm. Res.*, **5** (1) 425-427.
- Sayre L.M, Moreira P.I, Smith M.A, Perry G. (2005). Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease. *Ann. Ist. Super. Sanità.*, **41** (2) 143-164.
- Schneider C.P, Schwacha M.G, Chaudry I.H. (2004).The role of interleukin-10 in the regulation of the systemic inflammatory response following trauma-hemorrhage. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1689**, 22-32.
- Schroder K, Hertzog P.J, Ravasi T, Hume D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.*, **75**, 163-89.
- Seidel V (2005). Initial and Bulk Extraction. In: natural products isolation. Sarker S D, Latif Z, Gray A I. Eds. *Humana Press (Totowa)*, 27-37.
- Serhan C.N, Savill J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.*, **6**, 1191-1197.
- Serhan C.N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.*, **25**, 101-37.
- Serteyn D, Grulke S, Franck T, Mouithys-Mickalad A, Deby-Dupont G. (2003). La myéloperoxydase des neutrophiles, une enzyme de défense aux capacités oxydantes. *Ann. Med. Vet.*, **147**, 79-93
- Setty A.R, Sigal L.H. (2005). Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. *Semin. Arthritis Rheum.*, **34** (6), 773-784.
- Shahidi F, Ambigaipalan P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects -A review. *J. Funct. Foods*, **18**, 820-897.
- Shahidi F, Naczki M. (2003). Phenolics in food and nutraceuticals. *CRC press, Boca Raton*, 2<sup>nd</sup> ed, 132-237.
- Shaikh P.Z. (2011). Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. *Int. J. Pharm. & Life Sci.*, **2**, 1247-1263.
- Shi Y, Liang X.C, Zhang H, Wu Q.L, Qu L, Sun Q. (2013). Quercetin protects rat dorsal root ganglion neurons against high glucose-induced injury in vitro through Nrf-2/ HO-1 activation and NF- $\kappa$ B inhibition. *Acta. Pharmacol. Sinica.*, **34**, 1140-1148.
- Silva R.R, Oliveira e Silva D., Rollemberg Fontes H., Sales Alviano C., Dias Fernandes P. and Sales Alviano D. (2013). Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities of *Cocos nucifera* var. typical. *Complement. Altern. Med.*, **13**, 107

- Singh U, Devaraj S, Jialal I. (2005). Vitamin E, Oxidative Stress, and inflammation. *Annu. Rev. Nutr.*, **25**, 151-175.
- Sisein E.A. (2014). Biochemistry of free radicals and antioxidants. *Scholar Acad. J. Biosci.*, **2** (2) 110-118.
- Smaga I, Niedzielska E, Gawlik M, Moniczewski A, Krzek J, Przegaliński E, Pera J, Filip M. (2015). Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 2. Depression, anxiety, schizophrenia and autism. *Pharmacol. Reports.*, **67**, 569-580.
- Sohal R.S, Mockett R.J, Orr W.C. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis1, 2. *Free Radic. Biol. Med.*, **33** (5) 575-586.
- Soobrattee M.A, Neergheen V.S, Luximon-Ramma A, Aruoma O.I. Bahorun T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanisms and actions. *Mutat. Res.*, **579**, 200-13.
- Soto C, Recoba R, Barrón H,Avarez C, Favari L. (2003). Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, **136** (3) 205-212.
- Stahl W, Sies H. (1993). Physical Quenching of Singlet Oxygen and cis- trans Isomerization of Carotenoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **691** (1) 10-19.
- Stahl W, Sies H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Asp. Med.*, **24**, (6) 345-351.
- Stalikas C.D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids, *J. Sep. Sci.*, **30**, 3268-3295.
- Steinbeck M.J, Khan A.U, Karnovsky M.J. (1993). Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9, 10-diphenylanthracene and perylene in a polystyrene film. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15649-15654.
- Strehl A, Spies C.M, Buttgerit F. (2011). Pharmacodynamics of glucocorticoids. *Clin. Exp. Rheumatol.*, **5**, 13-18.
- Su J.J, Wang X.Q, Song W.J, Bai X.L, Li C.W. (2016). Reducing oxidative stress and hepatoprotective effect of the water extracts from Pu-erh tea on rats fed with high-fat diet. *Food Sci. Hum. Wellness*, **5**, 199-206.
- Sudha G, Sangeetha Priya M, Indhu Shree R, Vadivukkarasi S. *In vitro* free radical scavenging activity of raw pepino fruit (*solanum muricatum aiton*). *Int. J. Curr. Pharm. Res.*, **3** (2), 137-140.
- Sulaiman, CT, Thushar, KV, George, S, Balachandran, I. (2014). Phenolic characterisation of selected Salacia species using LC-ESI-MS/MS analysis. *Nat. Prod. Res.* **28** (13), 1021-1024.
- Tabart J, Kevers C, Sipel A, Pincemail J, Defraigne J.O. et Dommes J (2007). Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chem*, **105**, 1268–1275.
- Takahama U. (1983). Redox reactions between kaempferol and illuminated chloroplasts. *Plant Physiol.*, **71**(3) 598–601.
- Takahashi T, Maeda K.I, Nakamura Y, Okano Y, Ge N, Sone S. (2000). Interleukin-10 inhibits the production of inflammatory cytokines by antigen-stimulated mononuclear cells from asthmatic patients. *Allergol. Int.*, **49**, 55-62.

- Tangney C.C, Rasmussen H.E. (2013). Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. *Curr. Atheroscler. Rep.*, **15**, 324.
- Tapiero H, Tew K.D, Nguyen B.G. and Mathé G. (2002). Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. *Biomed. Pharmacother.*, **56**, 200-207.
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. (2005) Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.*, **90**, 333-340.
- Terblanche U, Semakalu CC, Mtunzi F, Pillay M. (2017). Screening of Variables Influencing Extraction Yield of *Cotyledon orbiculata*: 2 3 Full Factorial Design. *J. Pharmacogn. Phytochem. Res.*, **9(3)**, 303-312.
- Terkeltaub R, Bushinsky D.A, Becker M.A. (2006). Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel anti hyperuricemic therapeutics. *Arthritis Res. Ther.*, **8** (Suppl1):S4
- Traber K.J, Atkinson J. (2002). Vitamine E Antioxidant and nothing more. *Free Radic. Biol. Med.*, **43** (1) 4-15.
- Tracey K.J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, **420**, 853-859.
- Tréchet P, Jouzeau J.Y. (2014). Bases chimiques et pharmacologiques des AINS, *Rev. Fr. Allergol.*, **54**, 212-217.
- Tsao R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, **2**, 1231-1246.
- Tuberoso C.I.G, Bifulco E, Caboni P, Cottiglia F, Cabras P, Floris I. (2010). Floral markers of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 384-389.
- Tuberoso C.I.G, Boban M, Bifulco E, Budimir D, Pirisi F.M. (2013). Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: the case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chem.*, **140** (4), 686-691.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C.J, Telser J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, **266**, 37-56.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M.T.D, Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 44-84.
- Valko M, Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, **160** (1) 1-40.
- Van Helden Y.G.J, Keijer J, Knaapen A.M, Heil S.G, Briedé J.J, van Schooten F.J, Godschalk R.W.L. (2009).  $\beta$ -Carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **46**, 299-304.
- Varghese C.P, Ambrose C, Jin S.C, Lim Y.J, Keisaban T. (2013). Antioxydant and Anti-inflammatory Activity of *Eurycoma Longifolia* Jack, A traditional Medicinal Plant in Malaysia. *Int. J. Pharm. Sci. Naotechnol.*, **5** (4), 1875-1878.
- Vasconcelos S.M.L, Goulart M.O.F, Moura J.B.F, Manfredini V, Benfato M.S, Kubota L.T. (2007). Espécies reativas de oxigênio et de nitrogênio, antioxydants e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analiticoa para sua determinação. *Quim. Nova.*, **30** (5) 1323-1338.

- Verde A, Fajardo J, Riviera D, Obón C, Inocencio C. (2006). Catálogo de plantas y hongos recolectados en la provincia de Albacete y zonas próximas., *In: Guía etnobotánica de los alimentos locales recolectados en la provincia de Albacete. D.*
- Vicente S.J, Ishimoto E.Y, Torres E.A.F.S. (2014). Coffee modulates the transcription factor Nrf2 and highly increases the activity of antioxidant enzymes in rats. *J. Agr. Food. Chem.*, **12**, 116-122.
- Walle T, Ta N, Kawamori T, Wen P.A, Tsuji P.A, Walle U.K. (2007). Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids-methylated versus unmethylated flavones. *Biochem. Pharmacol.*, **73 (9)** 1288-1296.
- Wang I.K, Lin-Shiau S.Y. Lin J.K. (1999) Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome C release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukemia HL-60 cells. *Eur. J. Cancer*, **35 (10)**, 1517-1525.
- Wang S.Y, Chen, C.T. (2010). Effect of allyl isothiocyanate on antioxidant enzyme activities, flavonoids and post-harvest fruit quality of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L. cv. Duke). *Food Chem.*, **122 (4)** 1153-1158.
- Ward P.A. (2010). Acute and chronic inflammation. In: Fundamentals of Inflammation. Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW. Eds. *Cambridge University Press* (New York), 1-16.
- Weill B, Batteux F, Dhainault J. (2003). Réaction inflammatoire, Conduite à tenir : aspects biologiques et cliniques. In Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds De Boeck (Université Paris) pp : 12-23.
- Williams L.A, O'Connar A, Latore L, Denis O, Ringer S, Whittaker J.A, Conrad J, Vogler B, Rosner H, Kraus W. (2008). The in vitro antidenaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Med. J.*, **57**, 327-331.
- Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton J.R, Turner N.D. (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *Am. Soc. Nutr. Sci.*, **134 (3)**, 489-492.
- Wu P, Ma G, Li N, Deng Q, Yin Y, and Huang R. (2015). Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. *Food chem.*, **173**, 194-202.
- Yadav M, Yadav A, Yadav J.P. (2014). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. , *Asian J. Pac. Tropic. Med.*, **7 (1)**, 256-261.
- Yang H-L, Chen S-C, Chang N-W, Chang J-M, Lee M-L, Tsai P-C, Fu H-H, Kao W-W, Chiang H-C, Wang H-H, Hseu Y-C. (2006). Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 1513-1521.
- Yogannadam G.P, Ilango K, Suchitra D. (2010). Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of various extracts of *Punica granatum* L. (Lythraceae), *Int. J. Pharm. Tech. Res*, **2 (2)**, 1260-1263.
- Zeghal K.M, Sahnoun Z. (2013). La réaction inflammatoire et le stress oxydant. In book: *Abrégé de physiologie à l'usage des acupuncteurs et des réflexothérapeutes. Rouxville Y. Springer (Paris)*, 47-53.

- Zelek L, Latino-Martel P, Pecollo N, Barrandon E, Czernichow S, Galan P, Hercberg S. (2010). Vitamines et micronutriments. In: *Aider á vivre après un cancer Oncologie pratique*. Springer-Verlag, Paris, 277-282.
- Zhang M, Zhou J, Wang L, Li B, Guo J, Guan X, Han Q, Zhang H. (2014). Caffeic acid reduces cutaneous tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-6 and IL-1 $\beta$  levels and ameliorates skin edema in acute and chronic model of cutaneous inflammation in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 347-354.
- Zhang S, Qin C, Safe S.H. (2003). Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. *Environ. Health. Perspect.*, **111** (16), 1877-1882.
- Zhang Z, Tsao R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant anti-inflammatory effects. *Curr. Opinion Food Sci.*, **8**, 33-42.
- Ziche M, Morbidelli L, Pacini M, Geppetti P, Alessandri G, Maggi C.A. (1990). Substance P stimulates neovascularization *in vivo* and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc. Res.*, **40**, 264-278.
- Ziyyat A, Boussairi E.H. (1998). Cardiovascular effects of *Arbutus unedo* L. in spontaneously hypertensive rats. *Phyther. Res.*, **12**, 110-113.
- Ziyyat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.*, **58**, 45-54.
- Ziyyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Tahri A, Legssyer A, Hoerter J, Fischmeister R. (2002). *Arbutus unedo* induces endothelium-dependent relaxation of the isolated rat aorta. *Phyther. Res.*, **16**, 572-575.

## ملخص

تهدف هذه الدراسة الى تقدير النشاطية المضادة للأكسدة والمضادة للالتهاب لمستخلص الأسيئات الإيثيل (E.AE) ومستخلص البوتانول (E.But) لأوراق نبتة *Arbutus unedo*. أظهر التحليل الكمي للمركبات الفينولية أن E.AE يحتوي على أعلى كمية من عديدات الفينول والفلافونويدات. أظهرت المستخلصات فعالية في حماية كريات الدم الحمراء من الانحلال، وقوة ارجاع لا بأس بها في اختبار قدرة الارجاع واختبار الفوسفومولبيدات (PPM) مع تأثير احسن لـ E.AE مقارنة بـ E.But. كما أبدى هذا المستخلص الفعالية الاكبر في ازالة جذور DPPH، ABTS، جذر الهيدروكسيل، أنيون فوق الاكسيد و جذر فوق اكسيد الهيدروجين بقيم IC<sub>50</sub> 3.43 ميكروغرام/مل، 1.59 ميكروغرام/مل، 323.45 ميكروغرام/مل، 103.80 ميكروغرام/مل و 11.56 ميكروغرام/مل على التوالي. ثبت كل من المستخلصين اكسدة β-carotene بنسب 92% و 85%، وأكسدة حمض اللينولويك بنسب 89% و 70% لـ E.AE و E.But على التوالي. من جهة أخرى، تم اختبار الفعالية المضادة للأكسدة في الحي، حيث تم تقييم نشاطية إنزيم Catalase و SOD ومستويات MDA و GSH في أنسجة كبد الفئران. أظهرت النتائج محافظة المستخلصين على نشاطية إنزيم Catalase وزيادة معنوية في نشاطية SOD. تسبب كلا المستخلصين في انخفاض معتبر في مستوى GSH مقارنة بالمجموعة الشاهدة والمجموعة المعالجة بحمض الاسكوربيك، في حين لم يتأثر مستوى MDA مع أي من المستخلصين. أدى التطبيق الموضعي لكلا المستخلصين بتركيز 2 مغ/أذن، في نموذج وذمة الأذن المحفز بزيت الكروتون إلى تقليل الالتهاب بنسبة 74% و 66%. كما بينت النتائج أن كلا المستخلصين بتركيز 1 مغ/مل يثبطان هجرة الخلايا البيضاء ب 85.45% و 80.49% على التوالي. أظهرت أيضا المعالجة بالمستخلصين إلى تثبيط إتلاف بروتين الألبومين، كما تثبتت تحلل الكريات الدموية الحمراء بنسب 96% و 97% لكل من E.EA و E.But على التوالي، مقابل 98% لـ diclofenac. أظهرت هذه النتائج أن مستخلصي *Arbutus unedo* المستعملان في هذه الدراسة يملكان خصائص مضادة للأكسدة وللتهاب تعود إلى محتواهما من المركبات النشطة حيويًا، كالفلافونويدات وعديدات الفينول. على هذا، يمكن اعتبار هذه النبتة كمصدر غني بالمركبات النشطة حيويًا والتي تتميز بنشاطية مضادة للأكسدة و للالتهاب.

**الكلمات الدالة:** مضاد الإلتهاب، مضاد الأكسدة، *Arbutus unedo*، الفلافونويدات، عديدات الفينول.

## Résumé

Le but de la présente étude est l'évaluation des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et l'extrait butanolique (E.But) des feuilles d'*Arbutus unedo*. Les extraits ont présenté une activité antihémolytique, un bon pouvoir réducteur dans les tests du pouvoir réducteur et le test phosphomolybdate (PPM) avec un meilleur effet de l'E.AE par rapport à l'E.But. De même, l'E.AE a montré le plus important effet piégeur vis-à-vis du radical DPPH, ABTS<sup>••</sup>, du radical hydroxyle, d'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène avec des IC<sub>50</sub> de 3.43 µg/ml, 1.59 µg/ml, 323.45 µg/ml, 103.80 µg/ml et 11.56 µg/ml, respectivement. En plus, les deux extraits ont considérablement inhibé l'oxydation du β-carotène avec des taux de 92% et 85% et l'oxydation de l'acide linoléique avec des pourcentages de 89% et 70% pour l'E.AE et E.But respectivement. *In vivo*, l'activité de la catalase et de la SOD, et les taux du MDA et du GSH ont été évalués dans l'homogénat du foie de souris. Les résultats montrent une préservation de l'activité de la catalase et une augmentation significative de l'activité de la SOD. Les deux extraits ont induit une diminution significative du taux de GSH en comparaison avec le groupe contrôle et le groupe traité avec l'acide ascorbique. Par contre, le taux du MDA n'a pas changé. L'activité anti-inflammatoire des deux extraits a été également évaluée *in vivo* et *in vitro*. Le traitement local des souris par 2 mg/oreille d'E. AE ou d'E.But a inhibé significativement l'inflammation induite par l'huile de croton avec 74% et 66%, respectivement. De même, les deux extraits à la dose de 1 mg/poche ont significativement inhibé la migration des leucocytes (85.45% et 80.49%). D'autre part, le prétraitement par les deux extraits inhibe la dénaturation de la BSA et protègent les hématies contre l'hémolyse avec 96% et 97% pour l'E.AE et l'E.But respectivement contre 98% exercé par le diclofenac. Ces résultats montrent que les deux extraits d'*Arbutus unedo* ont des activités anti-oxydantes et anti-inflammatoires dues à la présence de composés bioactifs. En effet, l'analyse phytochimique a révélé que ces extraits sont riches en polyphénols et en flavonoïdes. Ainsi, la plante *Arbutus unedo* pourrait être exploitée comme source potentielle de composés bioactifs naturels doués d'activités anti-inflammatoire et antioxydante.

**Mots clés :** Anti inflammatoire, Antioxydant, *Arbutus unedo*, Flavonoïdes, Polyphénols.

## Abstract

In this study the antioxidant and the anti-inflammatory activities of ethyl acetate (E.AE) and butanol (E.But) extracts from leaves of *Arbutus unedo* were evaluated. Both extracts showed a significant protective effect against AAPH-induced erythrocyte hemolysis, with a good correlation between concentration and half-hemolysis time (HT<sub>50</sub>). The two extracts showed a good reducing activity in reducing power and phosphomolybdate (PPM) tests with remarkable effect of E.AE compared to E.But. E.AE also showed the most important scavenging effect against DPPH radical, ABTS radical, hydroxyl radical, superoxide anion and hydrogen peroxide with IC<sub>50</sub> values of 3.43 µg/ml, 1.59 µg/ml, 323.45 µg/ml, 103.80 µg/ml and 11.56 µg/ml respectively. In addition, the extracts inhibited the oxidation of β-carotene with percentages of 92% and 85% and the oxidation of linoleic acid with percentages of 89% and 70% for E.AE and E.But respectively. *In vivo*, catalase and SOD activities, MDA and GSH levels were evaluated in the homogenate of mouse liver. The results show a preservation of catalase activity and a significant increase in SOD activity. Both extracts induced a significant decrease in GSH levels compared to the control group and the group treated with ascorbic acid. On the other hand, the MDA level was not influenced. The anti-inflammatory activity of both extracts is also evaluated *in vivo* and *in vitro*. Topical application of 2 mg/ear of E.AE or E.But reduced ear edema induced by croton oil by 74% and 66% respectively. These values are higher than those obtained with indomethacin (53%) used as reference product. Similarly, both extracts (1mg/ear) inhibit leukocyte migration with 85.45% and 80.49% respectively. *In vitro*, both extracts prevented BSA denaturation and inhibited the erythrocytes hemolysis by 96% and 97% for E.AE and E.But respectively against 98% exerted by diclofenac. These results show that both extracts of *Arbutus unedo* have antioxidant and anti-inflammatory activities that could be exerted by their bioactive compounds. Indeed, phytochemical analysis revealed that these extracts are rich in polyphenols and flavonoids. Thus, *Arbutus unedo* plant could be exploited as a potential source of bioactive compounds with high antioxidant and anti-inflammatory activities.

**Key words:** Anti-inflammatory, Antioxidant, *Arbutus unedo*, Flavonoids, Polyphenols.