

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

N°...../SNV/2023

THÈSE

Présentée par

KHERBACHE Abdallah

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: BIOLOGIE

Spécialité: BIOCHIMIE

THÈME

**Activités anti-inflammatoires et antioxydantes d'extraits de
Helichrysum stoechas (L.) Moench.**

Soutenue publiquement le **09/09/2023**

DEVANT LE JURY

Président	Amira Smain	Pr. UFA Sétif 1
Directeur	Senator Abderrahmane	Pr. Univ Batna 2
Co-directeur	Bouriche Hamama	Pr. UFA Sétif 1
Examineurs	Dahmoune Farid	Pr. Univ Bouira
	Aoun omar	Pr. Univ M'sila

Laboratoire de Biochimie Appliquée

REMERCIEMENTS

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

*J'exprime ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, **Pr. Senator Abderrahmane** qui m'a orienté et dirigé au long de toutes mes années de recherche. Sa disponibilité, ses précieux conseils, sa compétence et sa compréhension m'ont permis de mener à terme ce travail.*

*J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon codirecteur de thèse, **Pr. Bouriche Hamama** qui a guidé, suivi le déroulement et l'exécution du travail de cette thèse en me prodiguant tout aide possible, et en me consacrant son temps précieux.*

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

*Monsieur **Pr. Amira Smain**, de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

*Monsieur **Pr. Dahmoune Farid** et monsieur **Pr. Aoun Omar** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Soyez assuré de ma profonde gratitude.

*J'exprime ma gratitude au **Pr. Raed M. Al-Zoubi** et **Pr. Assaf M. Areej** (Jordanie), Pour leur collaboration et leur aide à la réalisation de ce travail.*

Avec mes plus sincères remerciements.

*Mes remerciements sont aussi adressés à tous les membres de notre équipe de recherche, en particulier, **Laouicha Saliha** et **Kada Seoussen**.*

Merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

*C'est avec l'aide et la grâce de Allah que j'ai achevé ce modeste travail que
je dédie :*

A ma très chère mère

*Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de
tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et
de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours
pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez
éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as
cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à
l'âge adulte.*

A mon très cher père

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le
respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts
fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le
fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma
formation.*

A mes sœurs

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

A mes chères ami(e)s

*Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon
affection et mes pensées, vous êtes pour moi des frères, sœurs et des ami(e)s
sur qui je peux compter.*

A tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى معرفة التركيبة الكيميائية وتقييم النشاط المضاد للالتهاب والمضاد للأكسدة لكل من مستخلص اسيتات الايثيل والبوتانول لنبته *Helichrysum stoechas* (L.) Moench. بينت الدراسة الكيميائية ان مستخلص اسيتات الايثيل يحتوي على أعلى كمية من المركبات الفينولية والفلافونويدات. كما بين تحليل LC-ESI-MS وجود الإيزوكيرسيتين، الروتين، حمض الفيروليك و حمض الكلوروجينيك في كلا المستخلصين. أظهرت المعالجة الموضعية للفئران ب 2 مغ/للأذن من مستخلص اسيتات الايثيل والبوتانولي تثبيطا لالتهاب الأذن المحفزة بزيت Croton بنسب تراوحت بين 86% و 64%. كما أدت معالجة الفئران ب 1مغ/مل من مستخلص اسيتات الايثيل والبوتانولي إلى انخفاض معتبر لهجرة الخلايا المتعادلة نحو موقع الالتهاب، حيث تراوحت نسبة التثبيط بين 84% و 66%. بينت تجارب الزجاج أن حضان الخلايا المحفزة ب Concanavale A مع تراكيز مختلفة (1، 10، 50، 100 مكغ/مل) للمستخلصين إلى انخفاض افراز السيتوكين المحفز للالتهاب (IL-17A) و ارتفاع افراز السيتوكين المضاد للالتهاب (IL-10). ثبت المستخلصين تحلل الكريات الدموية الحمراء بنسب بين 90-98% كما ثبتا إتلاف بروتين الألبومين بقيم IC_{50} قدرت ب $101,20 \pm 4,17$ مكغ/مل و $93,79 \pm 0,76$ مكغ/مل، على التوالي. من جهة أخرى، تم تقدير النشاطية المضادة للأكسدة للمستخلصين باستعمال عدة تقنيات في الكائن الحي وفي الزجاج. أدت المعالجة اليومية للفئران عن طريق الفم ب 75، 150 و 300 مغ/كغ من المستخلصين خلال 21 يوم إلى تحسين مؤشرات الاجهاد التأكسدي (SOD, CAT, GSH, MDA) على مستوى النسيج الكبدي. بينت النتائج المتحصل عليها أن مستخلص اسيتات الايثيل والبوتانولي يمتلكان قدرة ازاحية عالية مضادة لكل من جذر DPPH ($IC_{50} = 5,07 \pm 0,36$ و $1,61 \pm 22,64$ مكغ/مل)، $ABTS^{*+}$ ($IC_{50} = 4,08 \pm 0,06$ و $10,11 \pm 0,44$ مكغ/مل)، جذر الهيدروكسيل ($IC_{50} = 179,31 \pm 2,01$ و $263,88 \pm 4,59$ مكغ/مل)، فوق أكسيد الهيدروجين ($IC_{50} = 54,82 \pm 1,50$ و $83,67 \pm 1,02$ مكغ/مل) و بيروكسيد الهيدروجين ($IC_{50} = 1,34 \pm 0,12$ و $2,00 \pm 0,17$ مكغ/مل). كما ابدى هذين المستخلصين فعالية ارجاع جد معتبرة. ثبت كلا المستخلصين أكسدة حمض اللينولييك بنسب تراوحت بين 82 و 87%. بالإضافة إلى ذلك، فقد ثبت ان كلا المستخلصين لهما تأثير وقائي كبير ضد تحلل كريات الدم الحمراء الناجم عن AAPH، مع زيادة في زمن نصف انحلال الدم (HT_{50}) بشكل مرتبط بالتركيز. بلغت قيمة HT_{50} المسجلة $185,58 \pm 7,45$ دقيقة و $138,50 \pm 1,57$ دقيقة لمستخلص اسيتات الايثيل او البوتانولي بتركيز 40 ميكروغرام/مل، مقارنة ب $52,30 \pm 0,31$ دقيقة للعينات غير المعالجة. كخلاصة، يمكن اعتبار *Helichrysum stoechas* (L.) مصدرا واعدا لمضادات الالتهاب ومضادات الاكسدة.

الكلمات المفاتيح: مضادات الالتهاب، مضادات الأكسدة، *Helichrysum stoechas*، الإجهاد التأكسدي، المركبات الفينولية.

Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits d'acétate éthylique (E.AE) et butanolique (E.But) de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench. L'étude phytochimique a montré que l'E.AE est le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes. L'analyse par LC-ESI-MS a permis d'identifier l'isoquercétine, la rutine, l'acide férulique et l'acide chlorogénique dans les deux extraits. *In vivo*, le traitement local des souris par 2 mg/oreille d'E.AE ou d'E.But a inhibé l'inflammation induite par l'huile de croton avec 86%-64%. De même, Le traitement des souris par 1 mg/poche d'E.AE ou d'E.But a réduit significativement le nombre des leucocytes ayant migrés vers le site enflammé avec un taux de 84-66%. *In vitro*, l'incubation des monocytes-concanavaline A stimulés, avec différentes concentrations (1, 10, 50, 100 µg/ml) des extraits a diminué la production de la cytokine pro-inflammatoire (IL-17A) et a augmenté la production de la cytokine anti-inflammatoire (IL-10). En outre, l'E.AE et l'E.But ont inhibé l'hémolyse des érythrocytes avec 90-98% et ont prévenu la dénaturation du BSA avec des IC₅₀ de l'ordre de 101.20 ± 4.17 µg/ml et 93.79 ± 0.76 µg/ml, respectivement. Les effets antioxydants des extraits étudiés ont été évalué en utilisant plusieurs tests *in vivo* et *in vitro*. L'administration quotidienne par voie orale de 75, 150 et 300 mg/kg de l'E.AE ou l'E.But durant 21 jours chez la souris a entraîné une amélioration des marqueurs du stress oxydant (GSH, CAT, SOD et MDA) au niveau du tissu hépatique. Les résultats obtenus *in vitro* montrent que l'E.AE et l'E.But exercent une forte activité antiradicalaire vis-à-vis des radicaux DPPH (IC₅₀ = 5.07 ± 0.36 et 22.64 ± 1.61 µg/ml), ABTS^{•+} (IC₅₀ = 4.08 ± 0.06 et 10.11 ± 0.44 µg/ml), radical hydroxyle (IC₅₀ = 179.31 ± 2.01 et 263.88 ± 4.59 µg/ml), anion superoxyde (IC₅₀ = 54.82 ± 1.50 et 83.67 ± 1.02 µg/ml) et peroxyde d'hydrogène (IC₅₀ = 1.34 ± 0.12 et 2.00 ± 0.17 µg/ml). De même, les extraits étudiés ont présenté un bon pouvoir réducteur concentration dépendant et inhibent l'oxydation de l'acide linoléique avec des pourcentages de 82-87%. De plus, les deux extraits ont exercé un effet protecteur important contre l'hémolyse érythrocytaire induite par l'AAPH, avec une bonne corrélation entre la dose et le temps de demi-hémolyse (HT₅₀). La valeur HT₅₀ obtenue est de 185.58 ± 7.45 min et 138.50 ± 1.57 min pour l'E.AE et l'E.But respectivement, à une concentration de 40 µg/ml, contre 52.30 ± 0.31 min pour le contrôle. En conclusion, cette étude a permis de montrer les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes très prometteuses des extraits de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench.

Mots clés: Anti-inflammatoire, Antioxydant, *Helichrysum stoechas*, Stress oxydatif, Polyphénols.

Abstract

The aim of this study is to determine the phytochemical composition and to evaluate the anti-inflammatory and the antioxidant activities of ethyl acetate (EAE) and butanolic (BuE) extracts of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench. The phytochemical study showed that EAE is the richest in polyphenols and flavonoids. LC-ESI-MS analysis allowed the identification of isoquercitrin, rutin, ferulic acid and chlorogenic acid in the two extracts. *In vivo*, the local treatment of mice by 2 mg/ear of EAE or BuE inhibited croton oil induced ear edema with 86-64%. Similarly, the treatment of rats with 1mg/pouch of EAE or BuE decreased significantly the number of leucocytes migrated to inflammation site with 84-66%. *In vitro*, our results showed that the incubation of concanavalin A stimulated monocytes with different concentrations (1, 10, 50, 100 µg/ml) of the extracts reduce the release of the pro-inflammatory cytokine (IL-17A) and increase the release of the anti-inflammatory one (IL-10). Moreover, the EAE and BuE extracts inhibited the erythrocytes hemolysis by 90-98% and prevented BSA denaturation with IC₅₀ values of 101.20 ± 4.17 µg/ml and 93.79 ± 0.76 µg/ml, respectively. The antioxidant effect of the studied extracts was evaluated using different assays *in vivo* and *in vitro*. The daily oral administration of 75, 150 and 300 mg/kg of EAE or BuE during 21 days showed an improvement in the status of oxidative stress markers (GSH, CAT, SOD and MDA) in liver tissue. The results obtained *in vitro* showed that EAE and BuE exert a high antiradical activity against DPPH (IC₅₀ = 5.07 ± 0.36 and 22.64 ± 1.61 µg/ml), ABTS⁺⁺ (IC₅₀ = 4.08 ± 0.06 and 10.11 ± 0.44 µg/ml), hydroxyl radical (IC₅₀ = 179.31 ± 2.01 and 263.88 ± 4.59 µg/ml), superoxide anion (IC₅₀ = 54.82 ± 1.50 and 83.67 ± 1.02 µg/ml) and hydrogen peroxide (IC₅₀ = 1.34 ± 0.12 and 2.00 ± 0.17 µg/ml) radicals. The studied extracts showed a good concentration dependent reducing power and inhibited linoleic acid oxidation by 82-87%. In addition, both extracts exerted a significant protective effect against AAPH-induced erythrocyte hemolysis, with a good correlation between concentration and half-hemolysis time (HT₅₀). The recorded HT₅₀ value reached 185.58 ± 7.45 min and 138.50 ± 1.57 min for EAE and BuE at a concentration of 40 µg/ml, versus 52.30 ± 0.31 min for the control. In conclusion, this study revealed a very promising anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum stoechas* extracts.

Key words: Anti-inflammatory, Antioxidant, *Helichrysum stoechas*, Oxidative stress, Polyphenols.

LISTE DES ABREVIATIONS

- AAPH:** 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
- ABTS:** Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)
- AINS:** Anti-inflammatoires non stéroïdiens
- AIS:** Anti-inflammatoires stéroïdiens
- BHT:** Butylated hydroxytoluene
- CAT:** Catalase
- COX:** Cyclooxygénase
- DL₅₀:** Dose létale 50
- DPPH:** 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
- E.AE:** Extrait d'acétate éthyle
- E.But:** Extrait butanolique
- EAG:** Equivalent d'acide gallique
- eNOS:** Oxyde nitrique synthase endothéliale
- EQ:** Equivalent de quercétine
- EVc:** Equivalent d'acide ascorbique
- GPX:** Glutathion peroxydase
- GSH:** Glutathion
- GSSG:** Glutathion dissulfide
- HMGB1:** Boîte de groupe de mobilité élevée 1
- HT₅₀:** Temps de demi-Hémolyse
- IC₅₀:** Concentration inhibitrice à 50%
- ICAM:** Molécule d'adhésion intercellulaire
- IFN γ :** Interféron γ
- IL:** Interleukine
- iNOS:** Oxyde nitrique synthase inductible
- LC-ESI-MS:** Chromatographie liquide couplée spectrométrie de masse
- LFA-1:** Antigène-1 associé fonction lymphocytaire
- LOX:** Lipooxygénase
- MAPK:** Protéine kinase activée par des agents mitogènes
- MDA:** Malondialdéhyde
- NF- κ B:** Facteur de transcription nucléaire κ B
- OCDE:** Organisation de Coopération et de Développement Economiques

PAF: Facteur activateur des plaquettes
PBMC: Cellules mononucléaires périphériques
PBS: Tampon phosphate
PLA2: Phospholipase A2
PMNs: Polynucléaires morphonucleaires neutrophiles
PPAR : Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes
ROS: Espèce réactive d'oxygène
RPMI: Roswell park memorial institute medium
SD: Standard déviation
SEM: Erreur standard de la moyenne
SOD: Superoxyde dismutase
TAC : Capacité antioxydante totale
TNF: Facteur de nécrose tumoral
VCAM-1: Molécules d'adhérence des cellules vasculaires -1
XO: Xanthine oxydase

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Evolution de l'inflammation aiguë.....	5
Figure 2. Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens	10
Figure 3. Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.....	11
Figure 4. Interaction potentielle entre le stress oxydant et l'inflammation	13
Figure 5. Les différentes réactions qui conduisent à la formation d'espèces réactives de l'oxygène	15
Figure 6. Sources et réponses cellulaires aux espèces réactives de l'oxygène	16
Figure 7. Cibles moléculaires des radicaux libres	19
Figure 8. Système de défense antioxydant dans l'organisme.....	21
Figure 9. Mécanismes de l'activité antioxydante des polyphénols	25
Figure 10. Photographie de <i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench	26
Figure 11. Droite d'étalonnage de l'acide gallique et de la quercétine	32
Figure 12. Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique	43
Figure 13. Profils chromatographiques de l'extrait d'acétate éthylique et butanolique de <i>H. stoechas</i> obtenus par LC-ESI/MS.....	48
Figure 14. Effet des extraits de <i>H. stoechas</i> sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris	51
Figure 15. Effet des extraits de <i>H. stoechas</i> sur l'infiltration des leucocytes vers la poche d'air.....	52
Figure 16. Effet des extraits de <i>H. stoechas</i> sur la production de l'IL-10.....	54
Figure 17. Effet des extraits de <i>H. stoechas</i> sur la production de l'IL-17A.....	54
Figure 18. Effet de l'extrait d'acétate éthylique et butanolique de <i>H. stoechas</i> sur la lyse des érythrocytes humains induite par un milieu hypotonique	56
Figure 19. Effet de l'extrait d'acétate éthylique et butanolique de <i>H. stoechas</i> sur la dénaturation de BSA.....	57

Figure 20. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> sur l'activité de la superoxyde dismutase	59
Figure 21. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> sur l'activité de la catalase.....	60
Figure 22. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> sur le taux du glutathion réduit.....	61
Figure 23. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> sur le taux du malondialdéhyde.....	61
Figure 24. Activité antiradicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> et du BHT vis-à-vis du radical DPPH'	63
Figure 25. Activité antiradicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> et du BHT vis-à-vis du radical ABTS ^{•+}	65
Figure 26. Effet piègeur du radical hydroxyle par l'extrait d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> et de l'acide ascorbique	66
Figure 27. Effet piègeur de l'anion superoxyde par l'extrait d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> et de l'acide gallique	68
Figure 28. Effet piègeur du peroxyde d'hydrogène par l'extrait d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> et de l'acide ascorbique	69
Figure 29. Cinétique de blanchissement du β -carotène en présence et en absence des extraits d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> et du BHT.....	71
Figure 30. Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> et du BHT.....	72
Figure 31. Pouvoir réducteur des extraits d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> et du BHT	73
Figure 32. Activité anti-hémolytique des extraits d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> et du Trolox.....	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Principaux médiateurs de l'inflammation.....	8
Tableau 2. Relations entre les maladies et le stress oxydant.....	21
Tableau 3. Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits d'acétate éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i>	46
Tableau 4. Composés phénoliques identifiés par LC-ESI/MS dans les extraits d'acétate éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i>	49
Tableau 5. Effet de l'extrait d'acétate éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> sur la catalase, SOD, GSH et MDA du surnageant du foie de souris.	58
Tableau 6. Capacité antioxydante totale des extraits d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i>	74
Tableau 7. Effet des extraits d'acétate éthyle et butanolique de <i>H. stoechas</i> et du Trolox sur la lyse érythrocytaire induite par l'AAPH.....	75

SOMMAIRE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION	1
I. Inflammation	4
I.1. Inflammation aiguë.....	4
I.1.1. Phase vasculaire	4
I.1.2. Phase cellulaire	6
I.1.3. Phase de résolution	6
I.2. Inflammation chronique	7
I.3. Médiateurs de l'inflammation	7
I.4. Traitement de l'inflammation.....	8
I.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	9
I.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens.....	9
I.4.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale.....	11
I.5. Relation inflammation et stress oxydant	12
II. Stress oxydant	14
II.1. Radicaux libres et espèces réactives.....	14
II.2. Sources des espèces réactives oxygénées.....	14
II.2.1. Sources endogènes.....	14
II.2.2. Sources exogènes.....	17
II.3. Rôles physiologiques des ROS	17
II.4. Principales cibles biologiques du stress oxydant	18
II.4.1. Peroxydation lipidique.....	18
II.4.2. Oxydation des protéines	18
II.4.3. Oxydation de l'ADN	19
II.4.4. Oxydation des glucides.....	20
II.5. Stress oxydant et pathologies	20
II.6. Antioxydants	20
II.6.1. Enzymes antioxydantes	22
II.6.1.1. Superoxyde dismutase	22
II.6.1.2. Catalase	22
II.6.1.3. Glutathion peroxydase	22

II.6.2. Antioxydants non enzymatiques.....	23
II.6.2.1. Glutathion	23
II.6.2.2. Acide urique.....	23
II.6.2.3. Vitamines	23
II.6.2.4. Polyphénols.....	24
III. <i>Helichrysum stoechas</i> (L.) Moench	24
III.1. Usage traditionnel	25
III.2. Phytochimie	26
III.3. Propriétés biologiques.....	27

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIEL ET METHODES	30
I. Matériel.....	30
I.1. Matériel végétal	30
I.2. Animaux	30
I.3. Sang humain	30
II. Méthodes	30
II.1. Préparation des extraits	30
II.2. Analyse phytochimique.....	31
II.2.1. Dosage des polyphénols totaux	31
II.2.2. Dosage des flavonoïdes	31
II.2.3. Analyse par LC-ESI/MS.....	33
II.3. Evaluation de la toxicité des extraits de <i>Helichrysum stoechas</i>	33
II.4. Activité anti-inflammatoire des extraits de <i>Helichrysum stoechas</i>	34
II.4.1. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	34
II.4.1.1. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton.....	34
II.4.1.2. Poche d'air induite par la carragénine chez la souris.....	34
II.4.2. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	35
II.4.2.1. Production de cytokines	35
II.4.2.2. Stabilité membranaire des érythrocytes humains	36
II.4.2.3. Inhibition de la dénaturation des protéines	37
II.5. Activité antioxydante des extraits de <i>Helichrysum stoechas</i>	37
II.5.1. Activité antioxydante <i>in vivo</i>	37
II.5.1.1. Détermination de l'activité de la superoxyde dismutase	38
II.5.1.2. Détermination de l'activité de la catalase	38

II.5.1.3. Dosage de glutathion réduit	38
II.5.1.4. Dosage du malondialdéhyde	39
II.5.2. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	39
II.5.2.1. Piégeage du radical DPPH [*]	39
II.5.2.2. Réduction du radical cation ABTS ⁺	39
II.5.2.3. Piégeage du radical hydroxyle	40
II.5.2.4. Piégeage de l'anion superoxyde.....	40
II.5.2.5. Piégeage du peroxyde d'hydrogène	41
II.5.2.6. Blanchiment du β-carotène	41
II.5.2.7. Peroxydation de l'acide linoléique.....	41
II.5.2.8. Pouvoir réducteur	42
II.5.2.9. Capacité antioxydante totale	42
II.5.2.10. Activité anti-hémolytique	43
II.6. Analyses statistiques	43
RESULTATS ET DISCUSSION.....	45
I. Phytochimie des extraits de <i>Helichrysum stoechas</i>	45
II. Toxicité des extraits de <i>Helichrysum stoechas</i>	47
III. Activité anti-inflammatoire des extraits de <i>Helichrysum stoechas</i>	49
III. 1. Activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	49
III. 2. Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	52
IV. Activité antioxydante des extraits de <i>Helichrysum stoechas</i>	57
IV.1. Activité antioxydante <i>in vivo</i>	57
IV.2. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	62
IV.2.1. Activité antiradicalaire	62
IV.2.2. Effet sur la peroxydation des lipides	70
IV.2.3. Activité réductrice	72
IV.2.4. Activité anti-hémolytique.....	75
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	78
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	80

INTRODUCTION



INTRODUCTION

L'inflammation est un mécanisme de défense de l'organisme contre les agressions d'origine physique, chimique, biologique ou infectieuse. Cette réponse immunitaire protectrice peut être parfois néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, des anomalies de régulation et de production des cellules intervenant dans l'inflammation. Ces processus inflammatoires sont impliqués dans l'apparition d'un grand nombre de pathologies humaines tel que l'arthrite, le diabète, l'asthme, les allergies et le cancer.

Le stress oxydant est fortement impliqué dans le développement et la perpétuation de l'inflammation, contribuant ainsi à l'apparition et/ou au maintien de nombreuses pathologies. Le stress oxydant provient d'un déséquilibre de l'homéostasie redox. Il se traduit par la formation excessive et/ou la faible élimination des radicaux libres qui sont des molécules très réactives soit de l'oxygène ou de l'azote. Ce déséquilibre entraîne des dommages oxydatifs des différentes molécules de la cellule (protéines, lipides et acides nucléiques) provoquant la mort cellulaire via l'apoptose ou la nécrose. Le stress oxydant est impliqué dans le vieillissement et la physiopathologie de nombreuses maladies, comme le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies inflammatoires (Belaïch et Boujraf, 2016).

L'utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) conduit à des effets secondaires souvent graves, comme les troubles gastro-intestinaux, rénaux et asthmatiques (Soubrier *et al.*, 2013). D'un autre côté, l'usage d'antioxydants de synthèse tels que le butylhydroxyanisole et le butylhydroxytoluène dans les secteurs agroalimentaire, cosmétique et pharmaceutique à long terme s'accompagne d'effets tératogènes, mutagènes et cancérigènes (Panicker *et al.*, 2014). Par conséquent, il est nécessaire de chercher de nouveaux agents thérapeutiques avec peu d'effets secondaires pour prévenir l'apparition de ces maladies d'origine inflammatoire et oxydative.

Les plantes représentent un réservoir inépuisable de métabolites secondaires qui possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Ces plantes sont utilisées en médecine traditionnelle sans règles scientifiques précises. Pour cela, les recherches sont orientés vers la valorisation de la médecine traditionnelle en vue de vérifier la sûreté et l'efficacité des plantes utilisées et d'établir des règles scientifiques pour l'usage de ces plantes.

C'est dans ce contexte que s'inscrit le présent travail qui a pour objectif principal d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes des extraits d'acétate éthylique et butanolique de la partie aérienne de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench.

Cette étude comporte quatre volets:

1. Le premier a été consacré à l'étude phytochimique visant principalement l'extraction, la quantification et l'identification des composés phénoliques par LC-ESI-MS.
2. Le second a été consacré à l'évaluation de la toxicité des extraits étudiés, dans le but de définir le seuil toxique et l'intervalle d'innocuité de ces extraits.
3. Le troisième volet, a été consacré à l'évaluation des activités anti-inflammatoires par l'utilisation de plusieurs modèles expérimentaux inflammatoires *in vivo* et *in vitro* à savoir :
 - Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris.
 - Poche d'air.
 - Production des cytokines.
 - Stabilité membranaire des érythrocytes humains.
 - Inhibition de la dénaturation des protéines.
4. Le quatrième volet a été consacré à l'évaluation de l'activité antioxydante par plusieurs tests *in vitro* (DPPH, ABTS, OH[•], O₂^{•-}, H₂O₂, blanchiment de la β-carotène, peroxydation de l'acide linoléique, pouvoir réducteur, TAC et l'hémolyse induite par l'AAPH) et *in vivo* en testant l'effet des extraits étudiés sur les marqueurs du stress oxydant (GSH, CAT, SOD et MDA).

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE



I. Inflammation

La réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression d'origine physique, chimique ou biologique dans le but de maintenir son intégrité (Medzhitov, 2008). Elle met en jeu de nombreux systèmes biologiques qui interviennent à des temps et des degrés variables: réactions biochimiques, activation cellulaire, coagulation, fibrinolyse, qui visent à détruire ou à éliminer la substance étrangère (Ashley *et al.*, 2012).

L'inflammation est un processus habituellement bénéfique. Parfois elle peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, ou encore des régulations anormales du processus inflammatoire. Elle est classée en deux catégories selon la durée et la cinétique du processus inflammatoire: la réaction inflammatoire aiguë et la réaction inflammatoire chronique (Noack et Kolopp-Sarda, 2018).

I.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est une réponse immédiate, de quelques jours à quelques semaines, d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes cardinaux: œdème, rougeur, douleur et chaleur. Ces symptômes sont liés aux effets des différents agents inflammatoires présents sur le site de l'agression (Noack et Kolopp-Sarda, 2018). Cependant, un échec dans la résolution provoque une infiltration incontrôlée et persistante des cellules inflammatoires, conduisant ainsi à la progression vers l'inflammation chronique (**figure 1**). La réponse inflammatoire aiguë se déroule en trois phases.

I.1.1. Phase vasculaire

La phase vasculaire est initiée avec une vasoconstriction artériolaire extrêmement brève, de quelques secondes, de type réflexe sous l'effet du système nerveux sympathique. Cette vasoconstriction va perturber le mouvement thrombocytaire dans la circulation sanguine et entraîner par conséquent l'activation des plaquettes, ces dernières interviennent de deux manières en colmatant d'abord la brèche et en synthétisant de la thromboxane A₂ qui est douée de propriétés agrégants et vasoconstrictrices puissantes (Buckley *et al.*, 2014). Parallèlement durant cette phase, l'activation du facteur XII de système de coagulation aboutit à la formation de la fibrine qui en plus de son rôle dans l'hémostase exerce un rôle

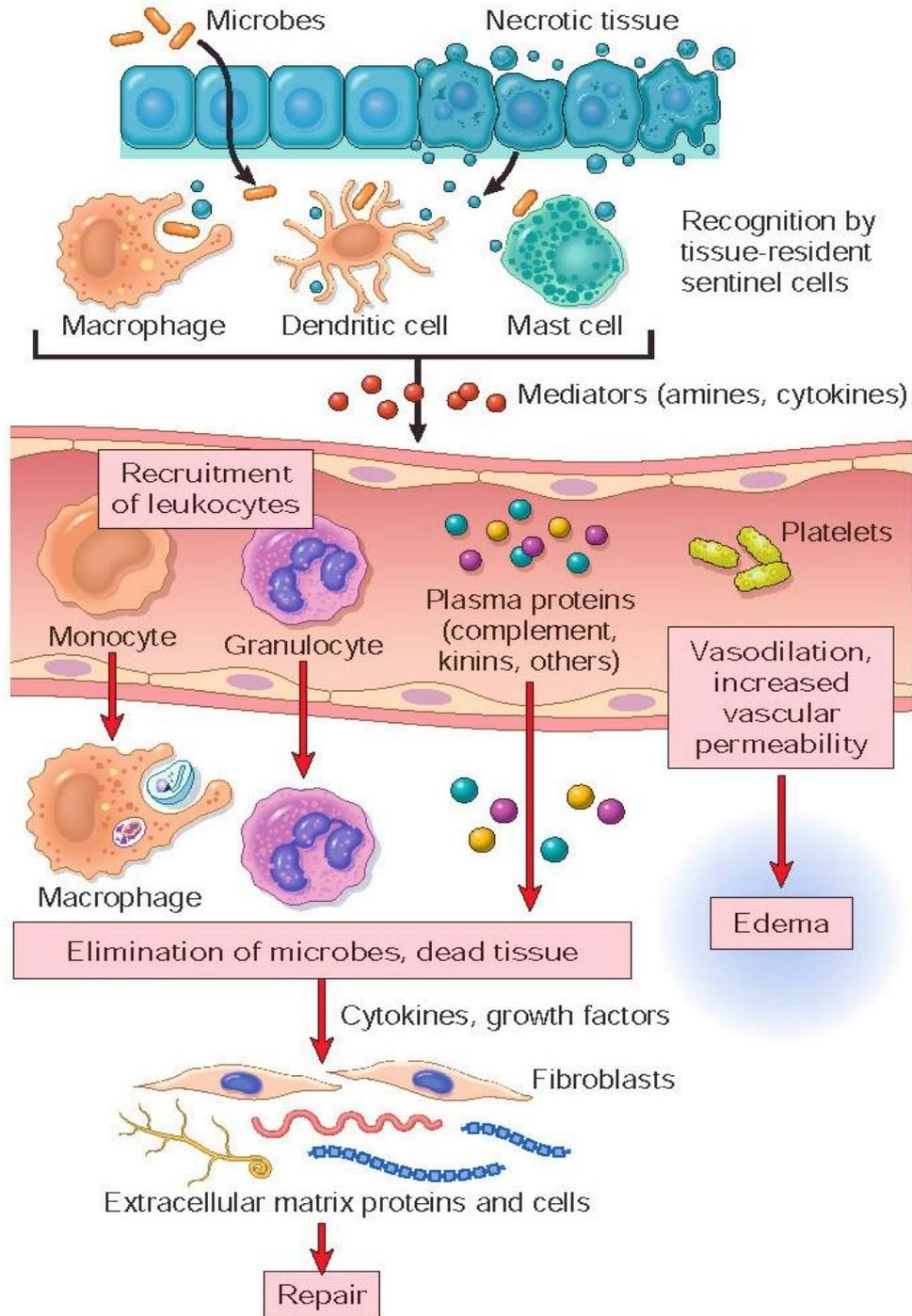


Figure 1. Evolution de l'inflammation aiguë (Kumar *et al.*, 2020).

chimiotactique pour les neutrophiles et augmente la perméabilité vasculaire en agissant sur le système des kinines (Weill et Batteux, 2003). Ces derniers, vont induire la production de plusieurs médiateurs tels que les eicosanoïdes et le monoxyde d'azote (NO) responsables de la vasodilatation des vaisseaux sanguins (Felipe *et al.*, 2007). Cette vasodilatation est accompagnée par une augmentation du débit de la microcirculation, ce qui explique

partiellement l'apparition de la chaleur et de la rougeur du site enflammé. En outre, ces médiateurs et d'autres comme les amines vasoactives vont augmenter la contraction des cellules endothéliales, ce qui augmente ainsi la perméabilité vasculaire et la formation de l'œdème, qui par distension des tissus provoque une hyperpression sur les terminaisons nerveuses locales et une sensation de tuméfaction et de douleur (Kumar et Jain, 2014).

I.1.2. Phase cellulaire

L'augmentation de la perméabilité vasculaire, la présence de plusieurs substances chimiotactiques attirent un grand nombre de cellules au niveau du foyer inflammatoire telles que les polynucléaires neutrophiles (PMNs), les monocytes/macrophages, les lymphocytes et les mastocytes. L'étape initiale de la phase cellulaire consiste en une margination des cellules de la circulation vers le site d'agression dans les 30 à 60 minutes qui suivent cette agression (Weill et Batteux, 2003). Les polynucléaires circulants sont attirés vers le foyer inflammatoire par des facteurs chimiotactiques. Les PMNs circulantes se marginalisent et adhèrent aux cellules endothéliales par l'interaction entre les sélectines de l'endothélium et leurs ligands présents sur les polynucléaires. Cette interaction ne permet pas un ancrage stable des polynucléaires qui vont simplement rouler à la surface de l'endothélium. La fixation stable nécessite des interactions plus fortes qui mettent en jeu le couple ICAM-1 sur l'endothélium et son ligand LFA-1 sur les polynucléaires. L'interaction de ces deux molécules bloque les PMNs et permet leur migration à travers l'endothélium (Aymeric et Lefranc, 2009). Au niveau des tissus infectés, les PMNs peuvent éliminer de nombreux pathogènes par phagocytose. Cette phagocytose peut être directe par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques des structures présentes à la surface de la bactérie, ou indirecte après opsonisation par des anticorps et des protéines du complément (Headland et Norling, 2015). La réaction inflammatoire pourrait s'arrêter à ce stade si les neutrophiles ne suffisent pas pour détruire l'agresseur, les macrophages, attirés par les facteurs chimiotactiques sécrétés par les neutrophiles, vont arriver sur le site (2-4 h plus tard) pour phagocyter les neutrophiles sénescents et tout autre corps étranger (Charles *et al.*, 2010).

I.1.3. Phase de résolution

La phase de résolution, ou de réparation, dépend du degré des lésions tissulaires. En effet, dans les conditions les plus favorables, les agents agresseurs sont éliminés par les polynucléaires neutrophiles, et les produits de dégradation ainsi que les débris cellulaires sont phagocytés par les macrophages. Les macrophages vont alors sécréter des cytokines et des médiateurs qui vont induire la phase de cicatrisation et de régénération tissulaire

(Soehnlein et Lindbom, 2010). Le retour à un état physiologique normale consiste dans un premier temps à la réparation de l'endothélium par les cellules endothéliales elles-mêmes, ces cellules pouvant produire et remodeler les éléments de leur stroma (collagène I et III) ou de leur lame basale (collagène IV et V, laminine) (Eming *et al.*, 2007). Si l'atteinte est plus sévère entraînant la destruction du tissu atteint, d'autres cellules vont intervenir pour réparer le nouveau tissu. Les macrophages vont participer à l'angiogenèse, mais ce sont surtout les fibrocytes puis les fibroblastes qui vont produire les protéines matricielles des tissus intercellulaires, comme le collagène, la fibronectine et la laminine pour reconstituer les tissus. Le système de l'angiogenèse est ainsi remis au repos et la réaction inflammatoire peut s'éteindre (Delves *et al.*, 2008).

I.2. Inflammation chronique

L'homéostasie tissulaire est régulée par une balance sensible entre le recrutement, la prolifération, la migration et la mort des cellules impliquées. Une dysrégulation de cette balance conduit à une réponse inflammatoire chronique irréversible (Lawrence et Gilroy, 2007). L'inflammation chronique correspond donc à un échec de l'inflammation aiguë et induit de nombreuses pathologies. L'infiltrat cellulaire perdure et contribue ainsi à l'hyperplasie et à la destruction du tissu. Le microenvironnement joue un rôle primordial dans ce processus. En effet, la production de cytokines et de chimiokines va favoriser la survie et le maintien des cellules sur le site inflammatoire. Les mécanismes et médiateurs impliqués dans le processus de l'inflammation chronique sont similaires dans différentes maladies inflammatoires chroniques telles que la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis ou encore la maladie de Crohn (Lowe et Storkus, 2011). Parmi ces agents communs, les cytokines représentent des facteurs primordiaux pour l'environnement cellulaire et systémique (Noack et Kolopp-Sarda, 2018).

I.3. Médiateurs de l'inflammation

La réponse inflammatoire provoque la libération de divers médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs sont des acteurs importants dans le processus inflammatoire. Ils augmentent la perméabilité vasculaire, attirent les leucocytes vers le lieu de l'inflammation, favorisent leur adhésion à l'endothélium et augmentent l'agrégation des plaquettes (Medzhitov, 2008). Le **tableau 1** résume l'origine et les effets des plus importants des médiateurs de l'inflammation.

Tableau 1. Principaux médiateurs de l'inflammation (Kumar *et al.*, 2020).

Médiateur	Origine	Action
Histamine	Mastocytes	Vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, activation endothéliale.
	Basophiles	
	Plaquettes	
Prostaglandines	Mastocytes	Vasodilatation, douleur, fièvre.
	Leucocytes	
Leucotriènes	Mastocytes	Augmentation de la perméabilité vasculaire, chimiotactisme, adhésion et activation leucocytaire.
	Leucocytes	
Cytokines (TNF, IL-1, IL-6)	Macrophages	Locale: Activation endothéliale (expression de molécules d'adhésion). Systémique: Fièvre, problèmes métaboliques, Hypotension.
	Cellules endothéliales	
	Mastocytes	
Chimiokines	Leucocytes	Chimiotactisme, activation leucocytaire.
	Macrophages activées	
Facteur d'agrégation plaquettaire (PAF)	Leucocytes	Vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, adhésion leucocytaire, chimiotactisme, dégranulation, explosion oxydative.
	Mastocytes	
Complément	Plasma (produit dans le foie)	Chimiotactisme et activation leucocytaire, complexe d'attaque membranaire, vasodilatation (activation mastocytaire).
Kinines	Plasma (produit dans le foie)	Augmentation de la perméabilité vasculaire, contraction des muscles lisses, vasodilatation, douleur.

I.4. Traitement de l'inflammation

Les anti-inflammatoires sont des médicaments connus de longues dates et qui restent encore parmi les plus utilisés en pratique clinique. Ils appartiennent à diverses classes

pharmacologiques et agissent via des mécanismes biochimiques très différents. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, issus des travaux concernant l'acide acétylsalicylique et la cortisone avec ses multiples dérivés (glucocorticoïdes) restent la base du traitement des maladies d'origine inflammatoire, qu'elle soit aiguë ou chronique (Nailwal et Doshi, 2021).

I.4.1. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont comme principal mode d'action l'inhibition de la synthèse des prostaglandines par le blocage de la cyclo-oxygénase (COX) (**figure 2**). La COX existe sous deux isoformes: la COX-1, dite constitutive, est impliquée dans la synthèse des prostaglandines physiologiques protectrices au niveau de la muqueuse gastrique et des reins; la COX-2, dite inductible, émerge dans les foyers inflammatoires et stimule la formation de prostaglandines pro-inflammatoires à action délétère (Becker et Monassier, 2018).

Divers stimuli (mécaniques, chimiques...) activent les phospholipases A2 contenues dans les membranes cellulaires, provoquant ainsi la transformation des phospholipides membranaires en acide arachidonique. Ce dernier est métabolisé en prostaglandines et thromboxane A2 grâce à la COX. Son inactivation par les AINS entraîne l'inhibition de la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais aussi celle des prostaglandines cytoprotectrices (prostacycline), notamment dans l'estomac et les reins, et du thromboxane A2 des plaquettes. Cette double action explique, d'une part, les effets anti-inflammatoires, et d'autre part, certaines manifestations indésirables digestives et rénales (Scheen, 2022).

I.4.2. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) appelés communément glucocorticoïdes sont des dérivés de synthèse de la cortisone. Ils constituent un groupe très homogène sur le plan structural avec une activité anti-inflammatoire puissante en plus des propriétés immunomodulatrices et antiallergiques (Malleme et Gogny, 2014). La corticothérapie a conquis une place de choix dans le traitement de toute une série de pathologies. Citons, outre les allergies et le rejet de greffe, de nombreuses affections rhumatologiques, dermatologiques, respiratoires, digestives et oculaires (Edwards, 2012).

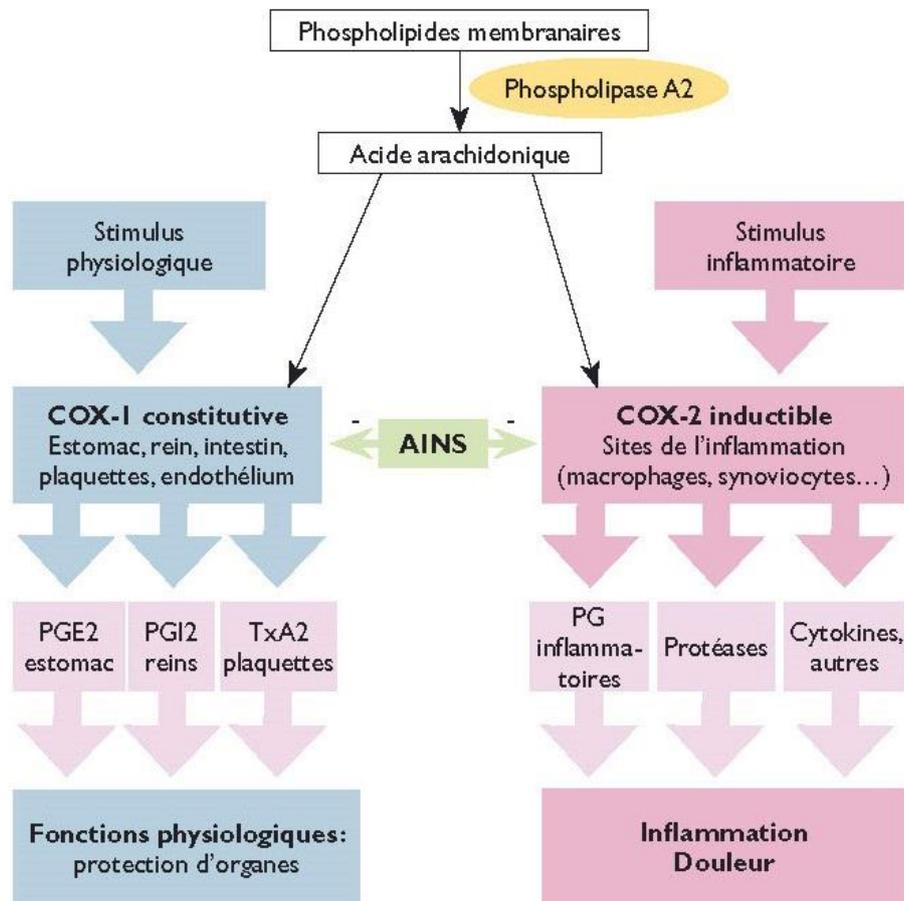


Figure 2. Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Brandstatter *et al.*, 2010).

Les corticoïdes agissent sur des récepteurs cytosoliques spécifiques. Ils exercent leurs actions essentiellement par des effets génomiques en agissant sur la transcription de l'ADN en ARN et sur la régulation post-transcriptionnelle des ARN messagers (**figure 3**). Ces glucocorticoïdes vont agir sur de nombreuses cibles, à la fois humorales et cellulaires. Sur le plan humoral, ils interagissent avec des cytokines et chémokines, des molécules d'adhésion, des enzymes, des molécules de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Au niveau cellulaire, ils interfèrent avec de nombreuses cellules cibles impliquées dans l'immunité innée ou adaptative, parmi lesquelles les macrophages, les polynucléaires, les mastocytes, les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, les fibroblastes, mais aussi d'autres cellules comme les cellules épithéliales, endothéliales, mésangiales et des muscles lisses (Quatrini et Ugolini, 2021). Cette panoplie d'effets explique à la fois leur remarquable efficacité dans toute une série de maladies inflammatoires et dysimmunitaires, mais aussi leur profil de sécurité délicat qui peut poser des problèmes en pratique clinique (Scheen, 2022).

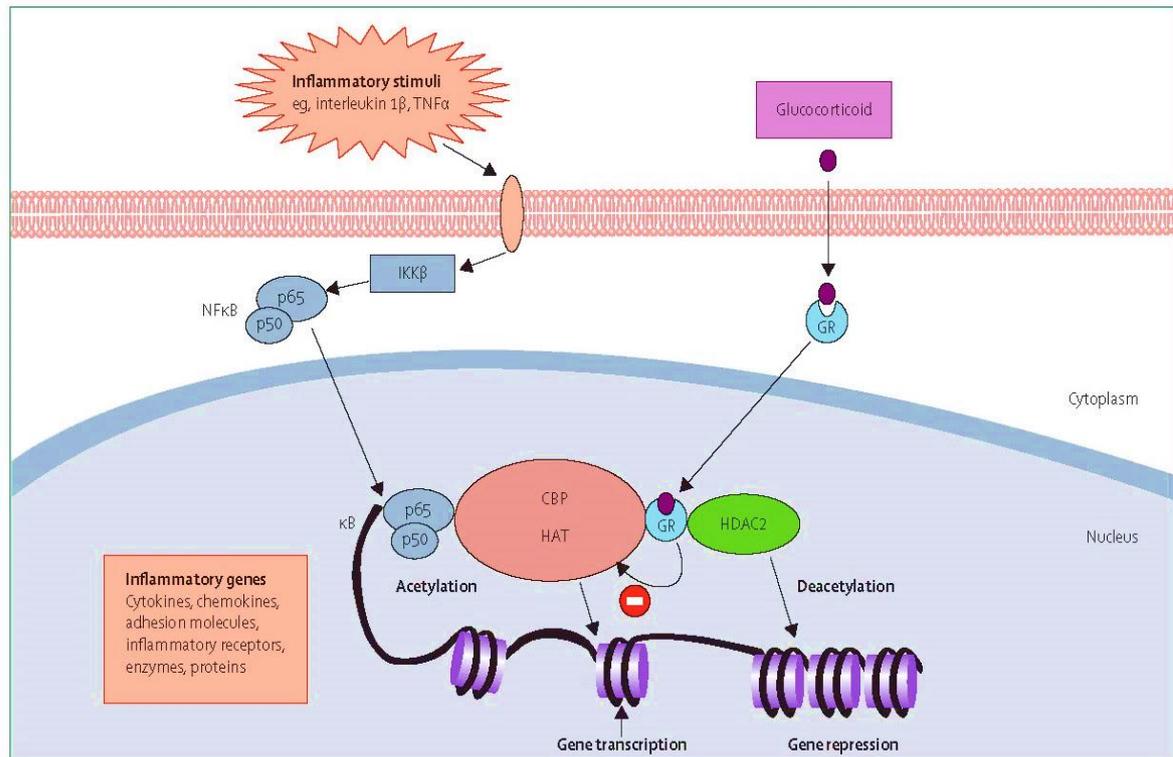


Figure 3. Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (Barnes et Adcock, 2009).

I.4.3. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les plantes médicinales sont largement utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde pour traiter ou soulager de nombreuses maladies inflammatoires. Les propriétés anti-inflammatoires de ces plantes sont dues principalement à leur richesse en métabolites secondaires comme les polyphénols, les terpènes, les alcaloïdes, les stérols, les caroténoïdes, les vitamines (A, E et C) et les huiles essentielles (Setty et sigal, 2005; Iwalewa *et al.*, 2007). L'activité anti-inflammatoire des composés phénoliques a été démontrée dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. Contrairement aux composés pharmacologiques qui agissent spécifiquement via un récepteur ou une voie de signalisation, les polyphénols ont des modes d'action multi-cibles. Ces substances actives peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase (Yoon et Baek, 2005), les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires (Capiralla *et al.*, 2012), la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion, l'activation du facteur NF- κ B et la production des espèces oxygénées réactives (Zeinalia *et al.*, 2017).

Des travaux menés *in vitro* ont montré que l'acide oléanolique, la curcumine, le kaempférol-3-O-sophoroside, le gallate d'épigallocatechine et le lycopène sont de puissants inhibiteurs de la protéine HMGB1, une importante protéine constitutive de la chromatine et qui joue un rôle clé dans l'inflammation (Bae, 2012). Le resvératrol inhibe la COX, inactive le récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR) et induit l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) chez les macrophages de souris et de rats (Speciale *et al.*, 2011; Biasutto *et al.*, 2012; Mohar et Malik, 2012). La curcumine a montré aussi des propriétés anti-inflammatoires en réduisant la production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , l'IL-1), des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) et d'autres médiateurs inflammatoires tels que les prostaglandines et les leucotriènes (Gupta *et al.*, 2011; Noorafshan et Ashkani-Esfahani, 2012; Marchiani *et al.*, 2014).

I.5. Relation inflammation et stress oxydant

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

Au cours des syndromes inflammatoires chroniques, les dérivés réactifs de l'oxygène ne participent pas seulement aux dommages moléculaires, cellulaires et tissulaires dont ils sont directement responsables, mais sont également fortement impliqués dans la régulation de la production d'autres médiateurs inflammatoires et, pour certains d'entre eux, dans l'orientation de la différenciation lymphocytaire (Reimund, 2002). Il a été montré que H₂O₂ active le facteur transcriptionnel nucléaire NF- κ B en activant certaines I κ B kinases responsables de la phosphorylation de I κ B, l'inhibiteur de NF- κ B et sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome (permettant ainsi la translocation de NF- κ B du cytoplasme vers le noyau), ou encore en favorisant la liaison de NF- κ B à ses sites de fixation sur l'ADN (Takada *et al.*, 2003). Parmi les gènes dont l'activation transcriptionnelle est placée sous le contrôle de NF- κ B, on peut citer les gènes codant pour le TNF- α , les interleukines (IL-1, IL -2, IL -6, IL -8), la iNOS, et bien d'autres encore. D'autres facteurs transcriptionnels

comme AP-1 sont aussi en partie sous le contrôle des dérivés réactifs de l'oxygène (Pinkus *et al.*, 1996).

Les cellules inflammatoires activées produisent également des cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , TNF α , IL-1 et IL-6), qui stimulent de façon réciproque la production des ROS par les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales. Ceci correspond à une boucle de rétrocontrôles positifs entre les médiateurs inflammatoires et oxydants respectivement (Castellani *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2016).

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

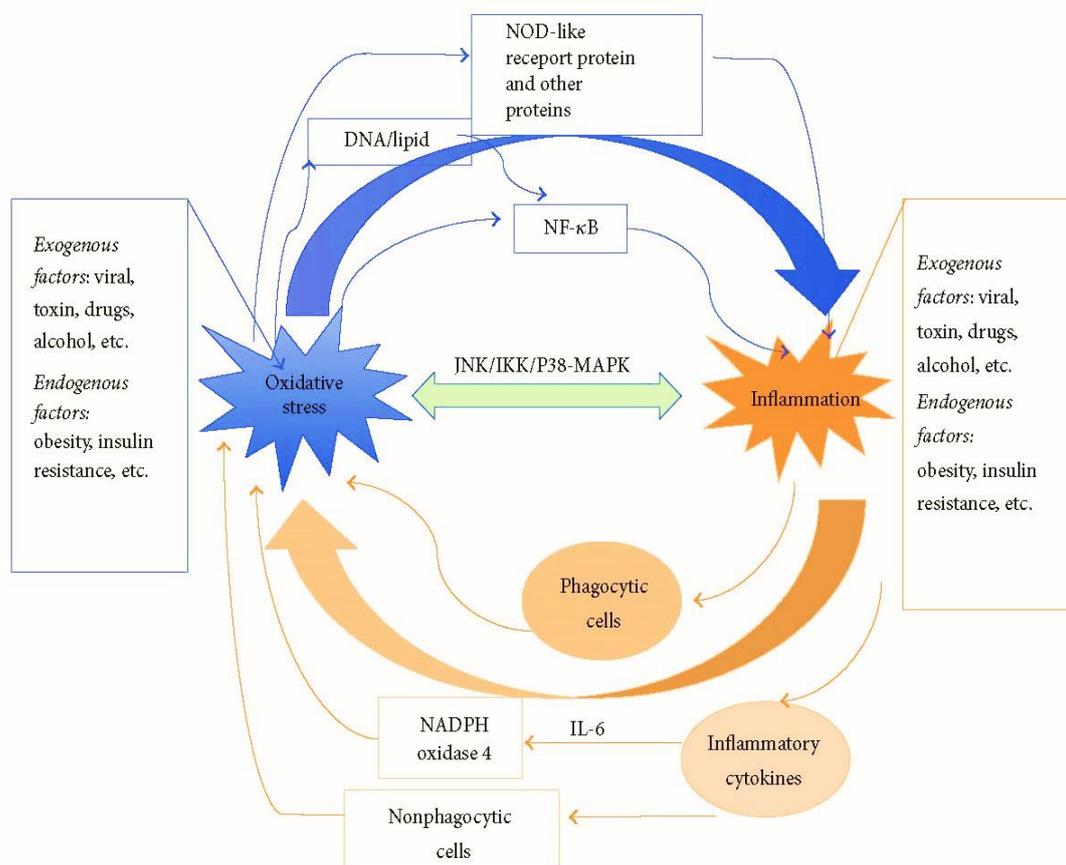


Figure 4. Interaction potentielle entre le stress oxydant et l'inflammation (Li *et al.*, 2016).

II. Stress oxydant

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les capacités de défense antioxydante de l'organisme. Produits de façon continue et élevée, les ROS sont à l'origine d'un réel stress oxydant avec modifications irréversibles de lipides, de protéines et d'acides nucléiques (Baudin, 2020). Le stress oxydant a été incriminé dans la physiopathologie de nombreuses maladies, en particulier le cancer, les maladies vasculaires et les maladies inflammatoires. Par ailleurs, les dommages moléculaires et cellulaires causés par les ROS seraient responsables des phénomènes du vieillissement (Bonnetfont-Rousselot *et al.*, 2019).

II.1. Radicaux libres et espèces réactives

Les radicaux libres sont des atomes ou molécules possédant un ou plusieurs électrons célibataires, ce qui les rend très instables. Elles tendent, ainsi, à réagir avec de nombreux composés, notamment les macromolécules situées à proximité de leur site de génération (Hokayem *et al.*, 2012).

Les radicaux libres incluent d'une part, les espèces réactives de l'oxygène représentées par, l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), les radicaux peroxy (ROO^{\cdot}), les lipoperoxy (LOO^{\cdot}) et les radicaux alkoxy (RO^{\cdot}), et d'autre part les radicaux libres azotés comme le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) et le dioxyde d'azote (NO_2^{\cdot}). Les classes des espèces réactives d'oxygène ou d'azote incluent également d'autres espèces réactives non radicalaires mais délétères pour l'organisme tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet (1O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$) et le peroxy-nitrite ($ONOO^-$) (figure 5).

II.2. Sources des espèces réactives oxygénées

Les ROS peuvent être d'origine endogène ou exogène (figure 6).

II.2.1. Sources endogènes

La chaîne respiratoire, la xanthine oxydoréductase, la NADPH oxydase et la myéloperoxydase représentent les principales sources endogènes des espèces réactives de l'oxygène.

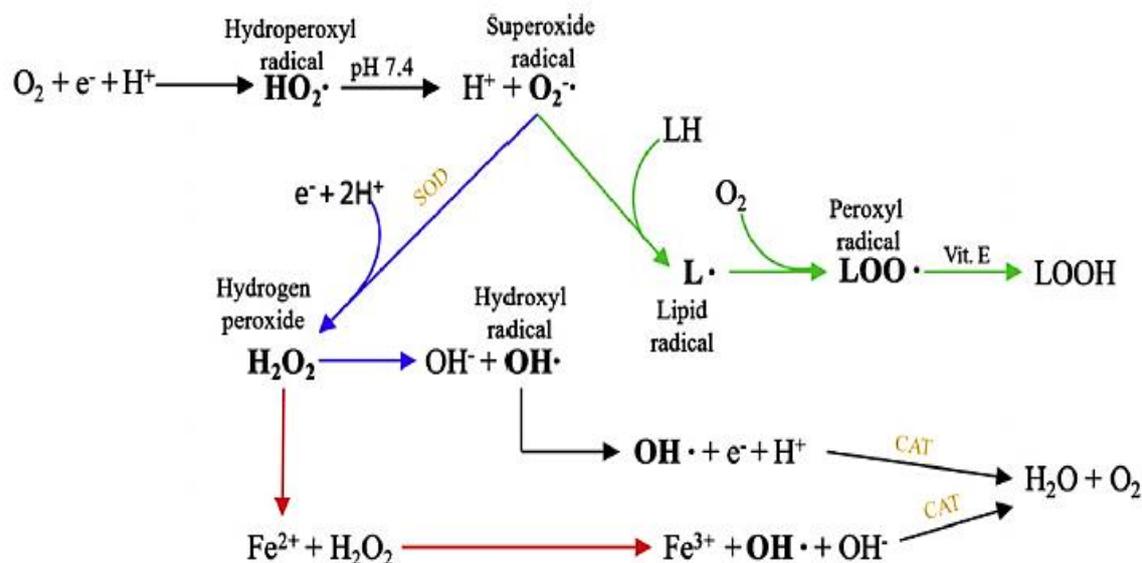


Figure 5. Les différentes réactions qui conduisent à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Carocho et Ferreira, 2013).

La chaîne respiratoire mitochondriale est constituée d'un ensemble de transporteurs d'électrons mobiles ou membranaires, qui assurent une réduction contrôlée de l' O_2 aboutissant à la formation de molécules d' H_2O . Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser fuir quelques électrons qui vont réduire partiellement l'oxygène. En effet, environ 2% de l'oxygène subit une réduction monoélectronique conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ au niveau de l'ubiquinone (coenzyme Q) (Gilbert *et al.*, 2013).

La xanthine oxydase (XO) est une source importante de radicaux libres. Elle catalyse l'hydroxylation oxydative de l'hypoxanthine en xanthine puis en acide urique, produisant au cours de chacune de ces deux réactions un anion superoxyde (Deaton et Marlin, 2011). La xanthine déshydrogénase produit quant à elle une molécule de peroxyde d'hydrogène par molécule d'hypoxanthine hydrolysée (Tessier et Marconnet, 2015).

La NADPH oxydase est un complexe multimérique, appartenant aux phagocytes et aux lymphocytes B. Elle catalyse le transfert d'électrons de son substrat (NADPH) à l'oxygène moléculaire entraînant la production d'anions superoxyde et de ses dérivés (peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle et l'oxygène singulet). Ces composés qui sont de puissants oxydants, sont capables de tuer les micro-organismes préalablement endocytés (Souza *et al.*, 2010).

Les neutrophiles possèdent également la myéloperoxydase qui catalyse la réaction du H_2O_2 produit à partir de $O_2^{\cdot-}$ avec des ions chlorure pour produire l'acide hypochloreux (HOCl) et participe à la lutte contre les agents pathogènes (Deaton et Marlin, 2011).

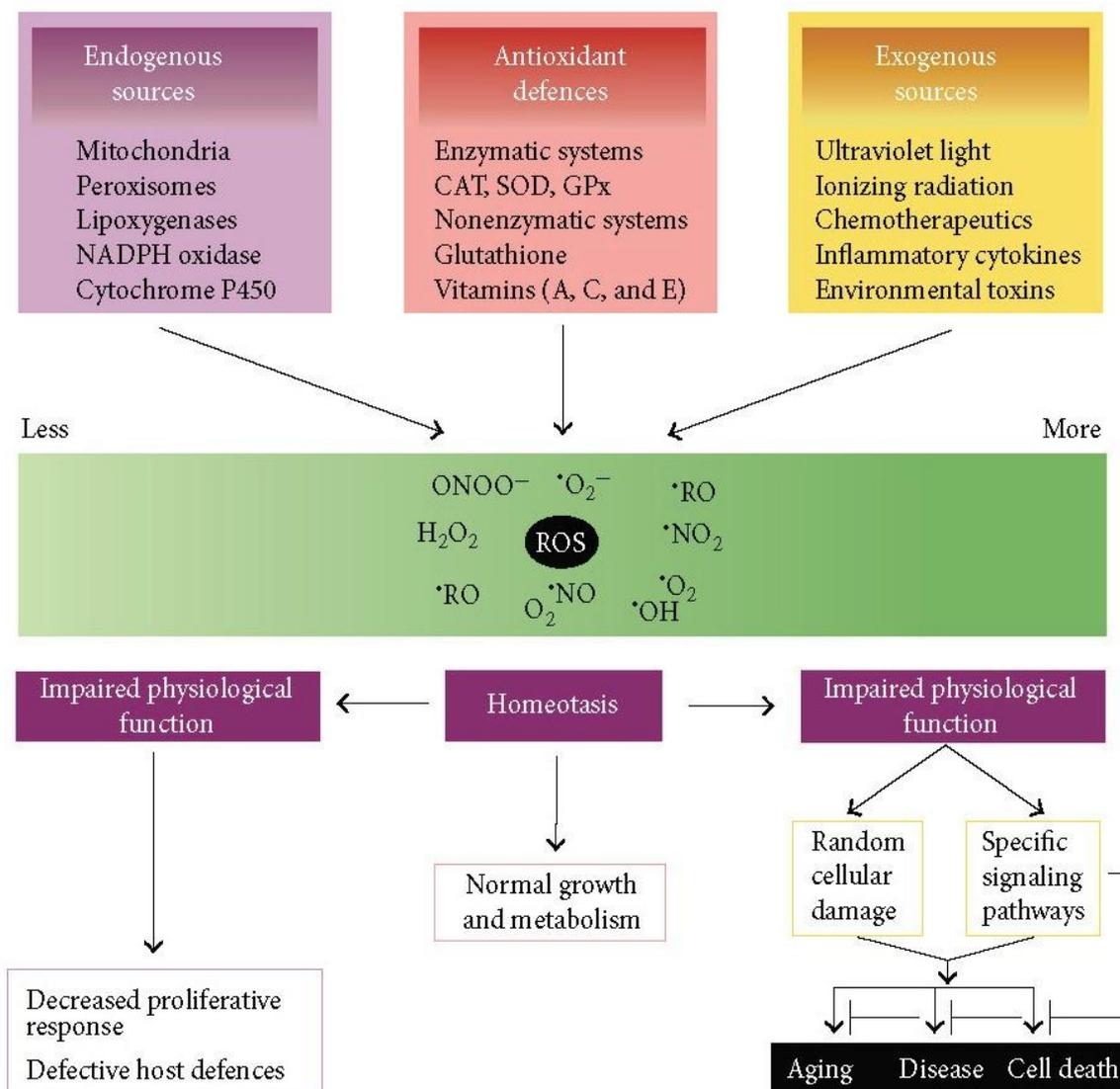


Figure 6. Sources et réponses cellulaires aux espèces réactives de l'oxygène (Santos *et al.*, 2018).

En plus de ces formes des ROS, les phagocytes activés sécrètent également le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}), formé lors de la conversion de la L-arginine en L-citrulline, catalysée par la eNOS (endothelial NOS) et iNOS (Ca^{2+} -independent inducible NOS) dans l'endothélium vasculaire (Bergendi *et al.*, 2013).

La transformation catalytique de l'acide arachidonique par les voies de la lipoxygénase conduit à la génération de OH^{\cdot} et $\text{O}_2^{\cdot-}$, suivis par des peroxydes lipidiques (Nanda *et al.*, 2007). Les produits finaux de la peroxydation lipidique par ces ROS, à savoir, l'acroléine et le 4-hydroxynonéal, exercent des effets cytotoxiques, qui provoquent des endommagements aux cellules (Barrera, 2012).

II.2.2. Sources exogènes

Les rayonnements induisent la synthèse de radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau (rayons X ou rayons γ) soit en activant des molécules photosensibles (UV) et peuvent produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet (Gambini et Granier, 2013).

Les métaux tels que le fer, le cuivre, le Zinc, le nickel, le cadmium et le mercure génèrent en présence du peroxyde d'hydrogène des radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton.

La fumée de cigarette contient un mélange complexe d'éléments réactifs aussi bien dans sa phase gazeuse que dans la phase particulaire. Chaque bouffée inhalée libère un grand nombre des molécules oxydantes où les ROS sont fortement présents (Birben *et al.*, 2012).

La toxicité de plusieurs médicaments chimiothérapeutiques est due à une production accrue des ROS (Aiassa *et al.*, 2015). L'interaction entre les toxines et les neutrophiles augmente significativement la production des ROS et conduit à un stress oxydatif, suivi par la mort cellulaire par apoptose (Paraje *et al.*, 2005).

II.3. Rôles physiologiques des ROS

Les espèces réactives de l'oxygène présentent un paradoxe dans leurs fonctions biologiques, puisqu'ils peuvent être à la fois nocifs mais aussi bénéfiques, voire indispensables pour les organismes vivants.

Les ROS sont impliqués dans la prolifération des cellules musculaires lisses et ont un rôle dans le tonus vasculaire notamment le monoxyde d'azote NO^* qui est un radical très diffusible, avec des effets régulateurs qui s'exercent sur plusieurs processus physiologiques, tel que le maintien du tonus vasculaire, la neurotransmission et le fonctionnement rénal (Uriu-Adams et Keen, 2005).

Ces espèces réactives de l'oxygène interviennent aussi dans la modulation de l'expression de gènes de structure codant pour des enzymes oxydantes (Birben *et al.*, 2012). Le O_2^* est capable de modifier l'activité enzymatique de la tyrosine kinase et de la sérine/thréonine kinases telles que les MAPK (mitogen-activated protein kinases) conduisant en aval à activer des facteurs de transcription qui vont initier l'expression de gènes " redox-sensibles " (Hurd *et al.*, 2012).

Les espèces réactives oxygénées et azotées participent aussi dans la défense de l'organisme par leur action toxique sur les bactéries par le phénomène de " burst oxydatif " dans les leucocytes, en particulier les polynucléaires neutrophiles (Uriu-Adams et Keen,

2005). Les phagocytes activés produisent des ROS en quantités suffisantes pour tuer les agents pathogènes. La NADPH oxydase phagocytaire produit des ions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène. La myéloperoxydase est une autre enzyme phagocytaire qui participe à ce burst oxydatif, en générant de l'acide hypochloreux, un des plus forts oxydants physiologiques. Cette production massive de ROS antimicrobiens constitue la première ligne de défense contre les agents pathogènes environnementaux (Pruchniak *et al.*, 2015).

Au cours du processus de fécondation, les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités de ROS afin de percer la paroi membranaire de l'ovule. Ces ROS sont aussi impliqués dans une phase plus tardive, durant l'embryogénèse. Un accroissement des espèces réactives de l'oxygène dans des cellules embryonnaires provoque l'apoptose requise pour l'élimination tissulaire durant la morphogénèse (O'Flaherty, 2015).

II.4. Principales cibles biologiques du stress oxydant

Malgré que les espèces réactives d'oxygène jouent un rôle positif dans les voies physiologiques normales et les fonctions nécessaires des cellules, leur production excessive est extrêmement toxique pour la vie cellulaire en endommageant les macromolécules telles que les protéines, les lipides, l'ADN et les glucides (**figure 7**).

II.4.1. Peroxydation lipidique

L'oxydation des lipides polyinsaturés, en présence d'oxygène, est un processus radicalaire de réactions en chaîne, appelée peroxydation lipidique, qui se décompose en trois étapes (Michel *et al.*, 2008). La phase d'initiation correspond à l'attaque d'une ROS pour arracher un hydrogène situé en α d'une double liaison d'un acide gras polyinsaturé (LH). Ce radical se stabilise par réarrangement, créant ainsi une réaction en chaîne (propagation), aboutissant à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) qui, sous l'action des métaux (Fe^{2+} ou Cu^{2+}), formera des radicaux alkoxydes (LO^{\bullet}) et hydroxydes (OH^{\bullet}). La phase terminale de dégradation conduira à des aldéhydes, parmi lesquels on peut citer le 4-hydroxynonéal (4-HNE), le malondialdéhyde (MDA), ou les isoprostanes (Rossary et Steghens, 2013). Les produits de peroxydation lipidique peuvent être mesurés dans les urines et le plasma en tant que marqueurs du stress oxydant (Gilbert *et al.*, 2013).

II.4.2. Oxydation des protéines

Les protéines sont aussi sensibles aux attaques radicalaires. Les ROS sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes des protéines. Les plus sensibles à leur action sont ceux possédant des chaînes latérales aromatiques (la tyrosine, le tryptophane et

l’histidine), sur lesquels l’OH• s’additionne. L’oxydation par les ROS conduit à la formation des ponts disulfures, sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, en modifiant la conformation de la protéine (Rahal *et al.*, 2014). Certaines enzymes cellulaires et protéines circulantes (transferrine, albumine) sont ainsi oxydées et inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques, et deviennent beaucoup plus sensibles à l’action des protéases (Sharma *et al.*, 2018).

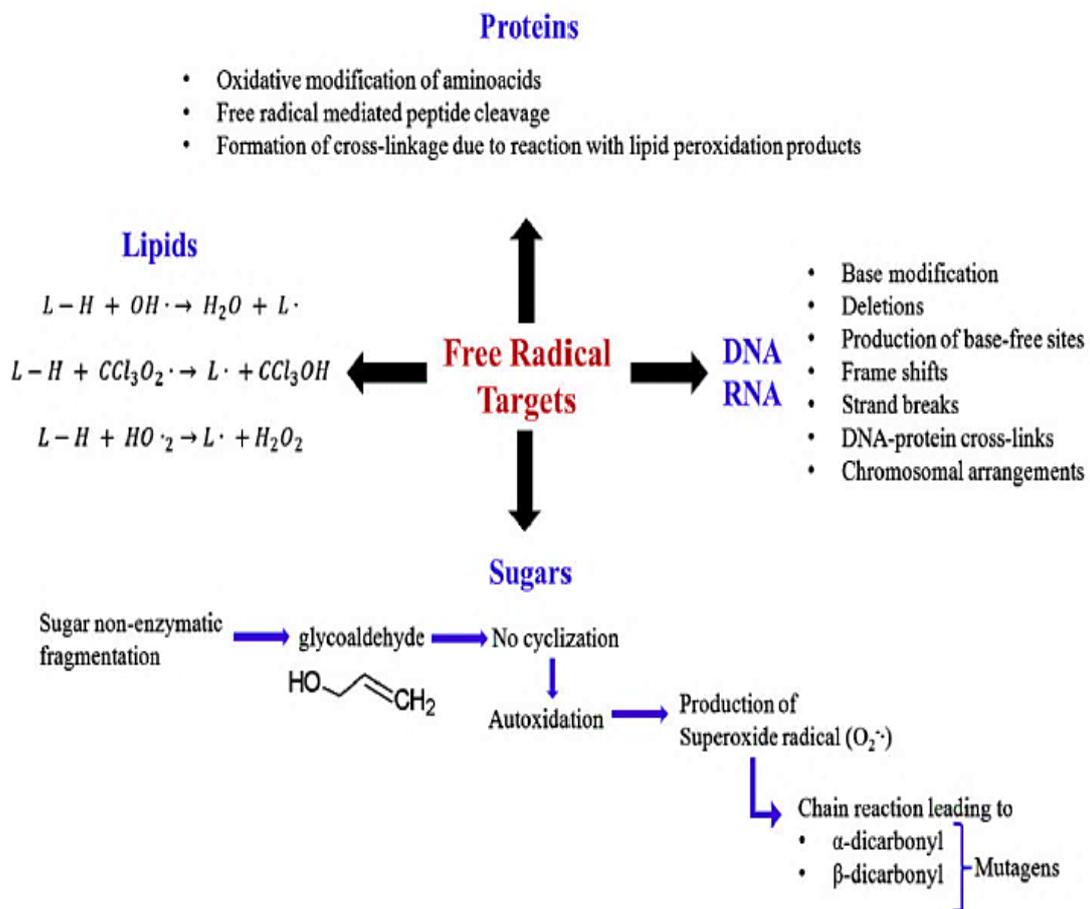


Figure 7. Cibles moléculaires des radicaux libres (Carocho et Ferreira, 2013).

II.4.3. Oxydation de l’ADN

Les bases nucléiques sont susceptibles d’être oxydées, ce qui serait à l’origine de mutations géniques ou de défauts de transcription. L’ADN mitochondrial paraît particulièrement exposé au stress oxydant, à cause de sa proximité avec la source des ROS, de l’absence d’histones protectrices, de la faible proportion de régions non codantes et des

faibles capacités de réparation de l'ADN (Lovell et Markesbery, 2007). L'attaque de l'ADN par les ROS en particulier le radical hydroxyle, peut entraîner des cassures dans la double hélice, des liaisons entre plusieurs brins d'ADN voire entre l'ADN et les protéines, et des modifications des bases. Ces altérations peuvent conduire à des malformations des protéines, au dysfonctionnement des cellules et même à la mort cellulaire. Le marqueur d'oxydation des acides nucléiques le plus utilisé est la 8-hydroxyguanosine (8-OHG), formé par l'hydroxylation en position 8 de la guanosine (Gilbert *et al.*, 2013).

II.4.4. Oxydation des glucides

Le glucose et les protéoglycanes du cartilage sont les cibles glucidiques préférées des ROS. L'oxydation du glucose est directe et donne des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine pour aboutir à la formation de produits finaux de glycosylation (PFG), soit par la formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine (glycosylation non-enzymatique) pour donner une protéine glyquée susceptible d'être attaquée par des ROS pour former des PFG (Boulanger *et al.*, 2002). Ces derniers sont d'une importance capitale, car en présence de métaux de transition ils favorisent la libération d' $O_2^{\cdot-}$ et fragilisent les parois vasculaires et la rétine chez les patients diabétiques (Gillery, 2006).

II.5. Stress oxydant et pathologies

Par la création de molécules biologiques chimiquement et irréversiblement anormales et la surexpression de certains gènes, le stress oxydant pourrait être la cause essentielle de plusieurs maladies tels, le cancer, la cataracte, la sclérose latérale amyotrophique et aussi le vieillissement accéléré (**tableau 2**). Dans certaines maladies multifactorielles à savoir le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires ; le stress oxydant agit comme un facteur potentialisateur de la genèse (Phaniendra *et al.*, 2015).

II.6. Antioxydants

Un antioxydant est une substance qui, à une concentration faible par rapport au substrat oxydable, retarde ou empêche l'oxydation de ce substrat. L'organisme utilise un ensemble d'antioxydants endogènes qui peuvent être de nature enzymatique ou non enzymatique et d'autres exogènes qui assurent sa protection contre les radicaux libres et leurs effets délétères (**figure 8**).

Tableau 2. Relations entre les maladies et le stress oxydant (Favier, 2006).

<p>Maladies dues à une production insuffisante de radicaux libres</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Agranulomatose septique • Psoriasis
<p>Maladies où le stress oxydant fait partie des facteurs déclencheurs</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie d'Alzheimer • Stérilités masculines • Maladies virales : EBV, HVB • Rhumatismes • Athérome • Asthme • Insuffisance respiratoire
<p>Maladies où le stress oxydant est la cause primordiale</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cancers • Auto-immunité • Cataracte • Dégénérescence maculaire • Sclérose latérale amyotrophique • Photo-vieillissement cutané • Photosensibilisation • Irradiation • Intoxications par CCl₄, Cd, Fe, alcool • Hémochromatose
<p>Maladies entraînant un stress oxydant secondaire</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Diabète • Insuffisance rénale • Mucoviscidose • Sida • Choc septique • Infarctus du myocarde • Ischémies/reperfusion • Parkinson • Brûlures • Thalassémie • Greffes d'organes <p>Traitements : • Anticancéreux • PUVA thérapie • Oxygène hyperbare</p>

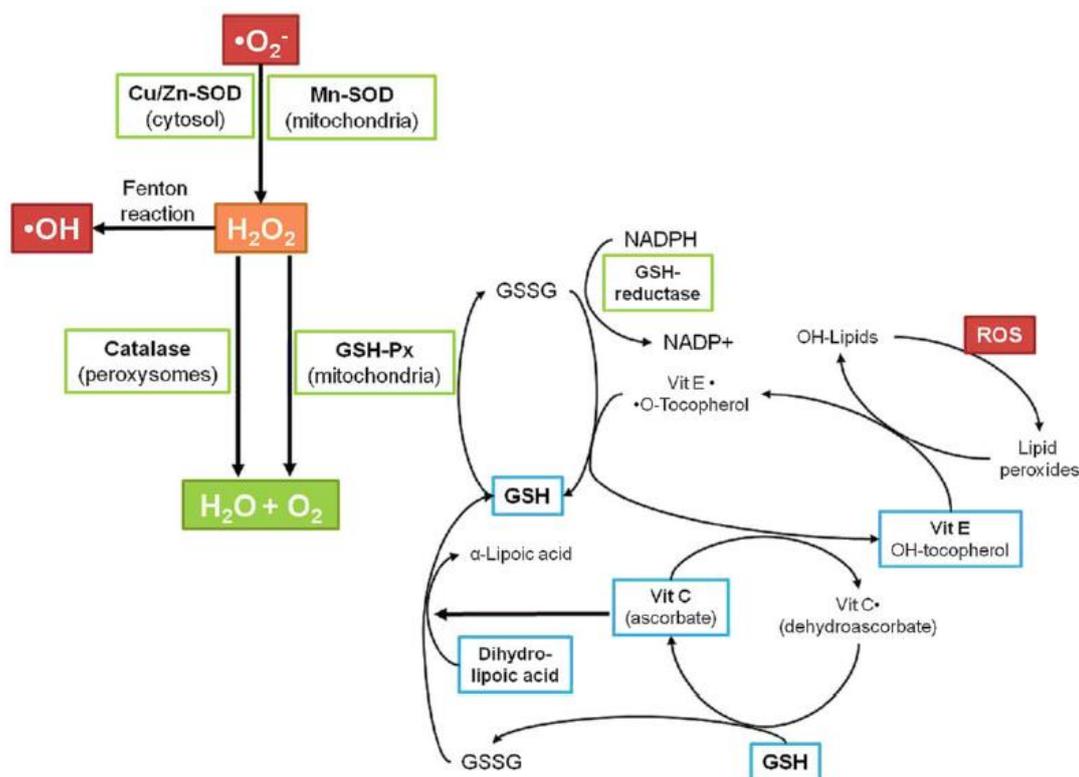


Figure 8. Système de défense antioxydant dans l'organisme (Kurutas, 2016).

II.6.1. Enzymes antioxydantes

Les enzymes antioxydantes les plus utilisées par la cellule pour se protéger des oxydants sont les SOD, la catalase et la GPX.

II.6.1.1. Superoxyde dismutase

Les superoxyde dismutases (SOD) catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Il existe trois types de SOD; elles sont toutes des métalloenzymes : chez les procaryotes, on trouve la SOD à fer (Fe-SOD) et une SOD à manganèse (Mn-SOD); chez les eucaryotes, une Mn-SOD dans les mitochondries et une SOD à cuivre/zinc (Cu/Zn-SOD) dans le cytosol des cellules (Sharma *et al.*, 2018). Le peroxyde d'hydrogène formé est pris en charge par les catalases et les glutathion peroxydases à sélénium (Zelko *et al.*, 2013).

II.6.1.2. Catalase

La catalase est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Elle est formée de quatre sous-unités, chacune comportant une molécule d'hème liant du fer sous forme Fe^{3+} , liée au site actif comme groupement prosthétique. La dissociation des sous-unités résulte en une perte de son activité. On la trouve essentiellement dans les peroxysomes et les hématies, lieux de production de H_2O_2 , ainsi immédiatement détoxifié (Zuo *et al.*, 2015).

II.6.1.3. Glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GPX) catalyse la réduction d'hydroperoxydes en alcools avec oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Cette réaction est couplée à celle régénérant le GSH, catalysée par la glutathion réductase. La GPX est une protéine constituée de quatre sous-unités comportant chacune un atome de sélénium, intégré dans le site actif sous forme de séléno-cystéine où l'atome de soufre est remplacé par un atome de sélénium. Un déficit en sélénium conduit à une baisse de l'activité de la GPX (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2019).

D'autres enzymes comme la glutathion transférase, les thiorédoxines réductases ou les thiorédoxines peroxydases et l'hème oxydase présentent également une activité antioxydante relativement importante (Kurutas, 2016).

II.6.2. Antioxydants non enzymatiques

II.6.2.1. Glutathion

Le glutathion est un tripeptide (glutamyl-cystéinyl-glycine) présent dans les cellules majoritairement sous forme réduite (GSH). Il représente la principale source cellulaire d'agents réducteurs ; il agit essentiellement par l'action des GPX. Par ailleurs, des glutathion S-transférases (GST) catalysent son transfert sur de nombreux substrats. Sa forme oxydée (GSSG) régénère la forme réduite sous l'effet de la glutathion réductase (Sharma *et al.*, 2018). Le glutathion participe au recyclage d'autres antioxydants comme les vitamines C et E et se lie aux toxines pour les transformer en composés hydrosolubles, facilement éliminés dans la bile ou les urines. Il participe également à l'éradication des métaux lourds de l'organisme (Tovmasyan *et al.*, 2015).

II.6.2.2. Acide urique

Dans la voie de dégradation de la purine, l'acide urique est un produit intermédiaire. Il représente l'un des plus importants antioxydants de faible masse moléculaire dans les fluides biologiques humains. L'acide urique agit comme un donneur d'électrons capable de stabiliser les radicaux hydroxyles, peroxydes, et l'oxygène singulet (Roumeliotis *et al.*, 2019). Outre son action de capteur des radicaux, l'acide urique peut également chélater les ions métalliques, comme le fer et le cuivre, les transformant en formes peu réactives incapables de catalyser les réactions radicalaires. Après réaction avec les ROS et d'autres agents oxydants, l'acide urique peut être oxydé en allantoiné et en plusieurs autres produits d'oxydation. Ainsi, le dosage de l'acide urique et/ou de l'allantoiné est un moyen pour évaluer le niveau de stress oxydatif chez l'homme (Tovmasyan *et al.*, 2015).

II.6.2.3. Vitamines

- **Vitamine C (acide L-ascorbique)**

L'acide ascorbique est un dérivé furanne, ressemblant à un sucre ce qui lui confère des propriétés hydrosolubles. La vitamine C est un réducteur et un antioxydant, en piégeant les ROS, en préservant le glutathion, en régénérant la vitamine E, et en manifestant un pouvoir réducteur sur le collagène, la DOPA et de nombreuses autres molécules oxydées. Elle est régénérée par le glutathion, la SOD et la catalase (Baudin, 2020).

- **La vitamine E (α -tocophérol)**

La vitamine E est la molécule antioxydante liposoluble la plus abondante de l'organisme humain. Elle est présente dans les membranes cellulaires et circule dans le sang sous forme

liée aux lipoprotéines (Fabre *et al.*, 2015). La vitamine E est un antiradicalaire puissant en captant l'électron célibataire, et le stabilisant par résonance, électron trouvé dans les radicaux oxygénés libres RO[•] (alcoolate) et ROO[•] (alcoxy), interrompant ainsi la chaîne de propagation radicalaire dans les membranes cellulaires. Elle évite également l'oxydation des acides gras, dont ceux portés par les lipides de faible densité (LDL oxydées) (Schmölz *et al.*, 2015).

- **La vitamine A (rétinol)**

La vitamine A est un terpène cyclique qui existe sous plusieurs formes dont le rétinol, qui représente la forme la plus active, le rétinal avec différentes isomères, et l'acide rétinoïque issus des carotènes naturels (Baudin, 2020). Les carotènes précurseurs sont transformés en rétinol sous l'action d'une monooxygénase ; les caroténoïdes regroupent les carotènes (α , β et γ) et des molécules apparentées potentiellement productrices de rétinol ou de ses dérivés. Les caroténoïdes et la vitamine A possèdent des propriétés antiradicalaires en piégeant les lipoperoxydes et protégeraient ainsi les LDL (Sharma *et al.*, 2018).

II.6.2.4. Polyphénols

Les polyphénols sont des composés issus du métabolisme secondaire des végétaux et caractérisés par la présence d'un ou plusieurs groupements phénoliques dans leur structure. Ils sont repartis en différents groupes, définis en fonction de la structure de leur squelette carbone (Amiot *et al.*, 2009). Les principales classes sont les acides phénoliques, les tannins et les flavonoïdes. Ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices (**figure 9**).

III. *Helichrysum stoechas* (L.) Moench

Helichrysum stoechas (L.) Moench (*H. stoechas*), est une plante aromatique appartenant à la famille des Asteraceae et au genre de *Helichrysum* qui renferme près de 500 espèces différentes (Albayrak *et al.*, 2010). Cette plante largement répandue dans les pays du bassin méditerranéen et dans l'Asie du Sud-Ouest est communément connue sous le nom de l'immortelle en français, gold-everlasting en anglais et chegara ou arfiya en arabe (Trabut, 2006 ; Hussain *et al.*, 2020).

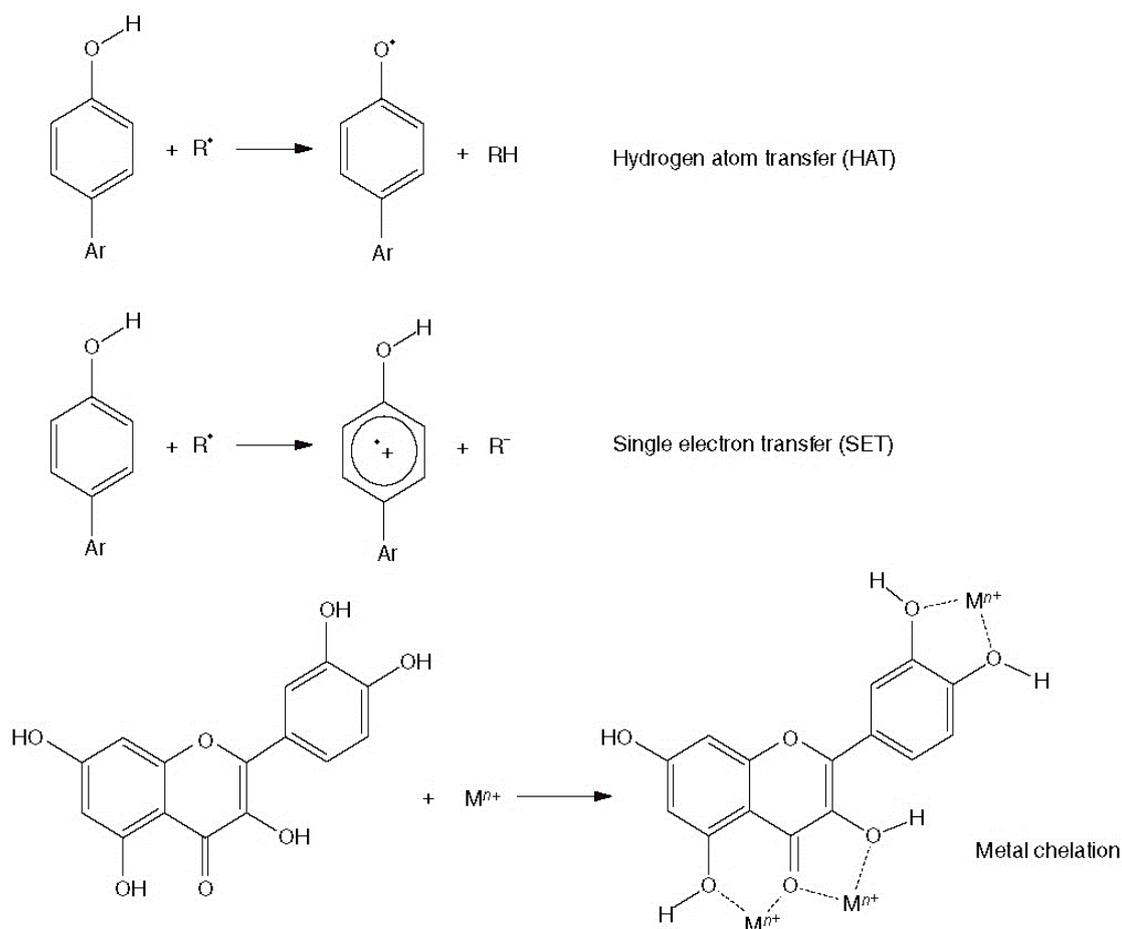


Figure 9. Mécanismes de l'activité antioxydante des polyphénols (Makris et Boskou, 2014).

H. stoechas est un arbuste vivace qui pousse spontanément sur les falaises, les sables maritimes, sur les rochers et dans les forêts claires. Elle peut atteindre jusqu'à 70 cm de haut. Ses tiges sont d'aspect laineux et blanchâtre, recouvertes d'un duvet cotonneux portent des feuilles alternes, tomenteuses en-dessus (bien que vertes), très blanches en-dessous (**figure 10**). Les capitules sont largement campanulés et hémisphériques, de 4 à 6 mm de diamètre regroupés en corymbes, de couleur jaune doré (Quezel et Santa, 1963 ; Haddouchi *et al.*, 2016 ; Silva *et al.*, 2017).

III.1. Usage traditionnel

Les espèces de *Helichrysum* ont été couramment utilisés en médecine traditionnelle comme tisanes pour traiter diverses maladies, dont l'inflammation, les troubles de la vésicule biliaire, les blessures, les infections et les affections respiratoires (Haddouchi *et al.*, 2014). Dans les pays d'Afrique du Nord, les graines, les racines et d'autres parties aériennes de *H.*

stoechas sont utilisées contre le paludisme, les rhumatismes, la goutte et dans l'élimination des calculs rénaux (Hussain *et al.*, 2020). Au Portugal, les décoctés de la plante sont utilisés contre le rhume, la bronchite et la fièvre (Barroso *et al.*, 2014). L'huile essentielle des parties aériennes de cette plante est utilisée en parfumerie et en industrie cosmétique (Lavault et Richomme, 2004).



Figure 10. Photographie de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench

III.2. Phytochimie

Plusieurs études phytochimiques ont montré que *H. stoechas* contient un amalgame de métabolites secondaires dans les diverses parties de la plante. Les *et al.* (2017) ont identifié dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne de cette plante 10 composés principalement de nature phénolique: deux phloroglucinols hétérodimères (l'arzanol et le 3-[3-acetyl-2,4,6-trihydroxy-5-(3,7-dimethyloct-2,6-dienyl) phenyl-methyl]-4-hydroxy-6,5-dimethyl-pyran-2-one), un homodimère α -pyrone (hélipyrone), trois acides phénoliques (acide *p*-hydroxybenzoïque, acide caféique et acide néochlorogénique), trois flavonoïdes (5,7-dihydroxy-3,6,8-triméthoxyflavone, isoquercitrine et quercétagine-7-O-glucopyranoside) et un diacylglycérol (santinol B). Les travaux de Hussain *et al.* (2020) ont abouti à l'isolement et la caractérisation d'un triterpène glycoside (Lanostan-3 β -olyl-26-oic acid 3-O- α -D-glycopyranoside) à partir de l'extrait éthanolique de cette plante. Sobhy et El-Feky

(2007) ont déterminé dans l'huile essentielle de *H. stoechas* plusieurs composés majoritaires, tels que l' α -pinène (59%), le limonène (16.7%), l' α -bisabolol (9.6%) et le β -caryophyllène (4%). L'extrait aqueux des feuilles et des fleurs contient l'acide chlorogénique, la cynarine et l'arzanol (Silva *et al.*, 2017). Plus récemment, Zengin *et al.* (2020) ont rapporté la richesse de l'extrait éthanolique en acide 5-*O*-caféoylquinique, acide protocatéchique, acide *p*-hydroxybenzoïque, acide caféique, acide *p*-hydroxyphénylacétique, quercétine, kaempférol, pinocembrine et galangine.

III.3. Propriétés biologiques

Les métabolites secondaires de *H. stoechas* confèrent à cette plante plusieurs propriétés pharmacobiologiques. En effet, plusieurs phénols isolés de cette plante possèdent des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes (Albayrak *et al.*, 2010 ; Ibrahim *et al.*, 2017), anti-inflammatoires et analgésiques (Hussain *et al.*, 2020), anxiolytiques et antidépresseurs (Borgonetti *et al.*, 2020), antiprolifératives, antidiabétiques et neuroprotectrices (Les *et al.*, 2017) et antilithiasique (Onaran *et al.*, 2016). L'extrait éthanolique de *H. stoechas* est caractérisé par une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase, la butyrylcholinestérase, l' α -amylase et l' α -glucosidase (Zengin *et al.*, 2020). Les huiles essentielles de cette plante possèdent une activité antifongique et antimicrobienne (Roussis *et al.*, 2002).

ETUDE
EXPERIMENTALE



MATERIEL
ET
METHODES

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

I.1. Matériel végétal

La plante *Helichrysum stoechas* a été récoltée en mai 2017 de la région de Beni Ourtilane, au Nord-Ouest de Sétif. L'identification de la plante a été faite par Dr. Djamel Sarri, Faculté des Sciences, Université de M'sila. La partie aérienne de la plante a été séchée à l'ombre et à température ambiante puis stockée à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

I.2. Animaux

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris femelles *Swiss albinos* dont le poids varie entre 25 et 30 g procurés auprès de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux répartis en groupes sont 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 standard fourni par l'Office National des Aliments de Bétails (ONAB) d'El Kseur (Bejaia). Après une semaine d'adaptation, les animaux sont pesés, marqués et soumis à jeun pendant une nuit avant leur utilisation.

I.3. Sang humain

Le sang humain frais est obtenu par prélèvement veineux au pli du coude des volontaires sains et non-fumeurs et qui n'ont pas pris de traitement médical pendant au moins quinze jours.

II. Méthodes

II.1. Préparation des extraits

Les extraits de *Helichrysum stoechas* ont été préparés par macération de 100 g de poudre de la partie aérienne préalablement broyée est placée dans 1000 ml du mélange méthanol/eau (7:3V/V) pendant 24 heures, sous agitation continue et à température ambiante. Après filtration, cette opération est renouvelée 3 fois. Les filtrats sont mélangés et évaporés sous pression réduite à 45°C dans un rotavapeur (BÜCHI R-210). Après séchage de l'évaporat, le résidu sec obtenu est repris par l'eau bouillante puis soumis à une décantation pendant une nuit à 4 °C. Le filtrat obtenu est traité successivement avec l'acétate éthylique et le *n*-Butanol.

Les deux phases organiques récupérées sont évaporées puis séchées pour obtenir l'extrait d'acétate éthylique (E.AE) et l'extrait butanolique (E.But) qui sont conservés à -32°C jusqu'à leur utilisation (Akkal *et al.*, 2010).

II.2. Analyse phytochimique

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques des extraits d'acétate éthylique et butanolique de *H. stoechas* est déterminée par le réactif du Folin-Ciocalteu comme décrit par Li *et al.*, (2007). Cette méthode est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) de 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. Pratiquement, 100 μl de différentes concentrations de chaque extrait ou de l'acide gallique sont mélangés avec 500 μl du réactif du Folin-Ciocalteu (10%). Après 4 min, 400 μl de Na_2CO_3 (7.5%) sont ajoutés. L'absorbance est mesurée à 765 nm après 1 h 30 min d'incubation. La concentration en polyphénols dans chaque extrait est exprimée en μg d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait (μg EAG/mg d'extrait), et calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (**figure 11A**).

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour déterminer la teneur en flavonoïdes totaux dans les extraits de *H. stoechas* (Bahorun *et al.*, 1996). Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (Fe^{+2} , Al^{+3}), ce phénomène traduit le fait que le métal perd 2 électrons pour s'unir à 2 atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons. La couleur jaune produite possède une absorbance maximale à 430 nm, l'intensité de coloration est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'extrait. Brièvement, 1 ml de la solution d'extrait est ajouté à 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2%). Après 10 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits est déduite à partir d'une droite d'étalonnage établie avec la quercétine (**figure 11B**) et est exprimée en μg d'équivalent de quercétine par mg d'extrait (μg EQ/mg d'extrait).

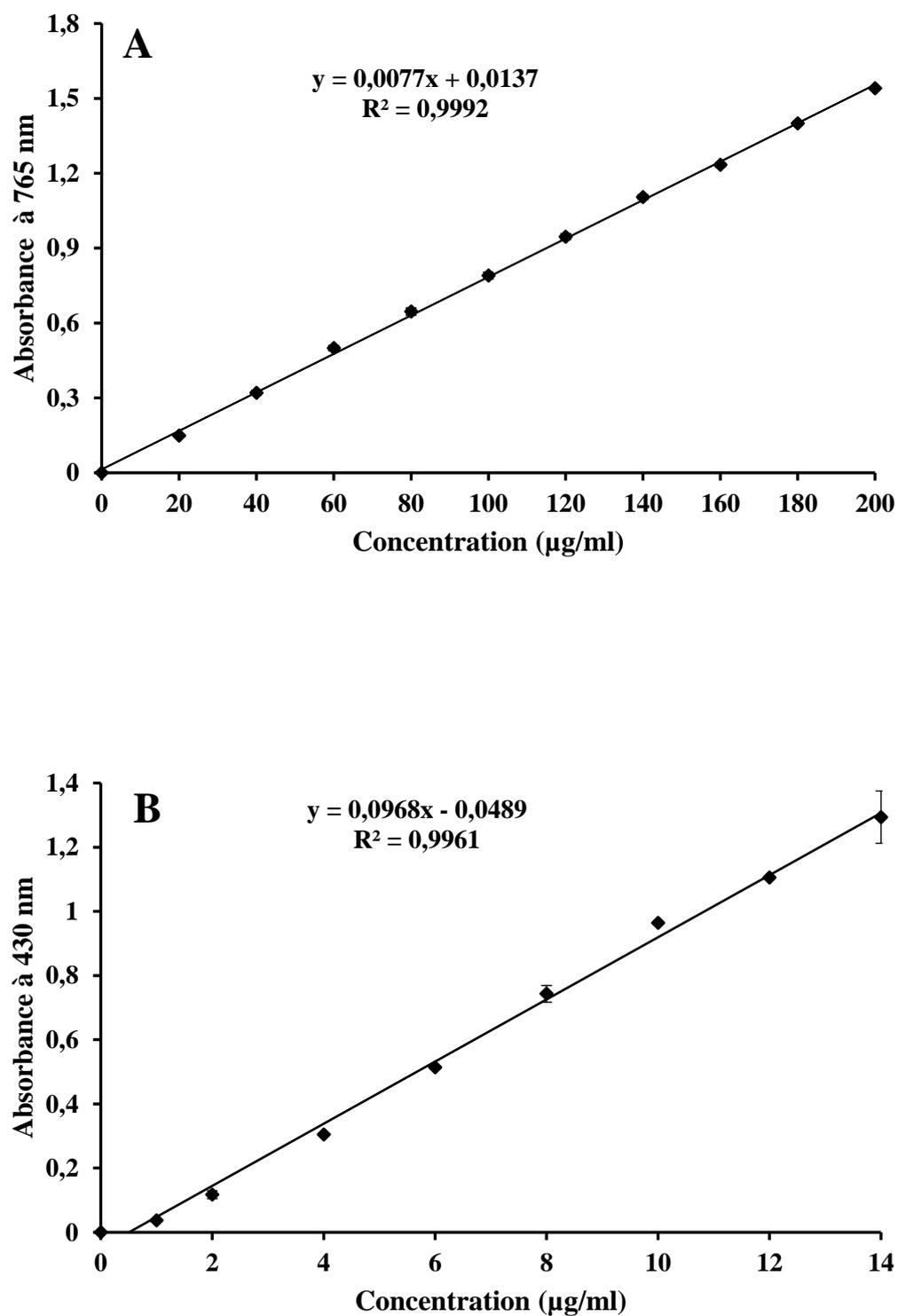


Figure 11. Droite d'étalonnage de l'acide gallique (A) et de la quercétine (B)

II.2.3. Analyse par LC-ESI/MS

L'analyse qualitative des composés phénoliques dans les extraits d'acétate éthylique et butanolique de *H. stoechas* a été effectuée par chromatographie liquide sur colonne à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI/MS) selon la méthode décrite par Sulaiman *et al.*, (2014). Un chromatographe Agilent Technology 1200 couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle (API-3200) avec une colonne de type ZORBAX SB-C18 (4.6 × 150 mm, 3.5 µm) ont été utilisés. Premièrement, les solutions des extraits (1 mg/ml) préparées dans le méthanol, sont filtrés à travers un filtre PTFE (0.45 µm) à l'aide d'un injecteur afin d'éliminer les particules. Ensuite, 20 µl de chaque solution sont injectés et laissés élués à travers la colonne par une phase mobile avec un débit de 1.0 ml/min à 35°C. Deux phases mobiles ont été utilisées ; la première (A) est composée d'eau bidistillée avec 0.1 % d'acide formique et la deuxième (B) est composée de l'acétonitrile. L'éluion est effectuée en mode gradient comme suit : 0-3 min (10% B) ; 4-8 min (10% B) ; 9-11 min (80% B) ; 12-13 min (80% B) ; 14-15 min (10% B). Le mode d'ionisation de l'instrument LC-ESI/MS est négatif, opérant avec l'azote à 650°C et un débit de 4.0 L/min, un électronebuliseur de 50 psi (3.45 bars), un voltage capillaire de 4500 V, 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. Evaluation de la toxicité des extraits de *Helichrysum stoechas*

Dans la présente étude, les lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE 425, 2008) ont été adoptées afin d'évaluer tout éventuel risque de toxicité des extraits de *Helichrysum stoechas* lors des tests biologiques. Pratiquement, une dose de 2000 mg/kg de chaque extrait a été testée sur des lots de 5 souris de poids homogène. Les souris sont réparties en 3 lots comme suit : Lot 1 (Témoin), Lot 2 (souris ayant reçu 2000 mg d'E.AE), Lot 3 (souris ayant reçu 2000 mg d'E.But). Les doses sont administrées *per os* (dose unique) et par voie orale. Les souris du groupe témoin ont reçu le même volume (10 ml/kg) d'eau distillée. Les lots de souris ont été mis en observation individuelle afin de noter les signes immédiats d'intoxication (dyspnée, salivation, troubles de la motricité, diarrhée, convulsion et ptôsis) pendant les 4 heures qui suivent les traitements puis régulièrement durant les premières 24 et 48 h et quotidiennement par la suite pendant 14 jours pour permettre d'enregistrer les effets tardifs y compris le nombre de mortalité.

II.4. Activité anti-inflammatoire des extraits de *Helichrysum stoechas*

II.4.1. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

II.4.1.1. Œdème de l'oreille induit par l'huile de croton

L'effet anti-œdémateux des extraits d'acétate éthylique et butanolique a été évalué en utilisant l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton (Manga *et al.*, 2004). Afin de provoquer une inflammation cutanée, les souris reçoivent sur la face interne de l'oreille droite 15 µl d'une solution acétone-eau (1:1) contenant 80 µg d'huile de croton comme agent irritant. Les souris traitées reçoivent localement 2 mg/oreille d'E.AE, d'E.But 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. La différence de l'épaisseur avant et après l'application de l'agent phlogogénique est calculée. Le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe témoin selon la formule suivante :

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

Δ **Témoin** : différence d'épaisseur pour le groupe témoin.

Δ **Traité** : différence d'épaisseur pour le groupe traité.

II.4.1.2. Poche d'air induite par la carragénine chez la souris

L'induction de la poche d'air a été réalisée par l'injection sous-cutanée de 3 ml d'air stérile dans la région interscapulaire des souris. Pour maintenir la forme de la poche, 1.5 ml d'air stérile ont été réinjectés dans la poche lors du 3^{ème} et du 6^{ème} jour de l'expérience (Colville-Nash et Lawrence, 2003). Lors du 7^{ème} jour, les souris reçoivent directement dans la poche 1 ml de NaCl stérile (0.9%) contenant 1 mg d'extrait d'acétate éthylique ou butanolique de *H. stoechas* ou 0.1 mg/poche d'indométacine. Les souris du groupe témoin reçoivent 1 ml de NaCl stérile seulement. Une heure après, tous les groupes reçoivent 0.1 ml de λ -carragénine (1%). Quatre heures après le traitement, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Une incision est pratiquée et l'exsudat de la poche est récupéré après l'injection de 1 ml de NaCl stérile dans la cavité de la poche. Afin de déterminer le nombre de leucocytes ayant migrés dans la poche d'air, une dilution 1/10 de l'exsudat a été réalisée par une solution Türk. Le comptage des leucocytes est effectué à l'aide d'une cellule Thoma

avec un objectif X40. Le pourcentage d'inhibition de la migration de leucocytes est calculé par rapport au groupe témoin considéré comme 100% selon la formule suivante :

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

N_T : nombre des leucocytes du groupe témoin.

N_E : nombre des leucocytes du groupe traité.

II.4.2. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

II.4.2.1. Production de cytokines

a. Isolement des leucocytes mononucléaires

L'isolement des leucocytes mononucléaires du sang périphérique humain (PBMCs) a été effectué selon la méthode décrite par Amro *et al.*, (2013). Pratiquement, le sang héparinisé et dilué (1:1, V/V) dans le milieu de culture RPMI 1640 (Roswell park memorial institute medium) est déposé délicatement dans des tubes coniques de 50 ml contenant le même volume de ficoll. Après centrifugation à 1250 rpm pendant 20 min à 22°C, la couche translucide entre le plasma et le ficoll est récupérée soigneusement à l'aide d'une pipette pasteur stérile dans des tubes stériles de 15 ml. Afin d'éliminer toutes les cellules contaminantes, des séries de lavage par le RPMI 1640 et de centrifugation à 1480 rpm pendant 5 min et à 22°C sont effectuées. Le culot cellulaire obtenu est repris par 1 ml de RPMI 1640.

b. Comptage des cellules

Afin de déterminer le nombre des PBMCs obtenus, 50 µl de la suspension cellulaire sont rigoureusement mélangés avec 50 µl de bleu trypan (0.4%), puis le nombre est déterminé à l'aide d'une cellule de Neubauer. La concentration cellulaire est estimée par la formule suivante :

$$[C] = N \times F \times 10^4$$

[C] : concentration cellulaire (cellule/ml).

N : nombre de cellules comptées dans les 16 carreaux de l'hématimètre.

F : facteur de dilution.

10^4 : facteur spécifique de l'hématimètre, utilisé pour obtenir le nombre de cellules dans un volume égal à un millimètre.

Après comptage des cellules, une dernière centrifugation a été effectuée afin de récupérer les cellules dans le milieu de culture complet (RPMI 1640 supplémenté par le sérum de veau fœtal 10%, la L-glutamine 2 mM, la gentamicine 50 µg/ml, la pénicilline 100 U/ml et la streptomycine sulfate 100 mg/ml) à une concentration de 2×10^5 PBMCs/ml.

c. Culture cellulaire et dosage des cytokines

La culture cellulaire a été réalisée dans des microplaques de 24 puits, où les monocytes (2×10^5 cellules/ml) sont incubés en présence de différentes concentrations des extraits (1, 10, 50 et 100 µg/ml) et de 5 µg/ml de concanavaleine A (Con A) dans une étuve à atmosphère humide à 37°C et 5% de CO₂. Les puits contrôles qui ne contiennent pas des extraits sont incubés en présence de la Con A. Après une nuit d'incubation, les surnageants sont récupérés par centrifugation (1200 rpm/10 min à 22°C) et la quantité de cytokines l'IL-10 et l'IL-17A libérée a été déterminée par ELISA suivant le protocole décrit par le fabricant (Invitrogen, UK).

II.4.2.2. Stabilité membranaire des érythrocytes humains

La capacité des extraits étudiés à protéger la membrane des érythrocytes humains contre l'hémolyse induite par le milieu hypotonique est évaluée selon la méthode décrite par Debnath *et al.*, (2013). Brièvement, 125 µL de la suspension érythrocytaire diluée à 10% dans un milieu isotonique (tampon phosphate 10 mM, pH=7.4, 154 mM NaCl) sont ajoutés à 1.25 ml de chaque extrait à différentes concentrations (1, 2, 3 mg/ml) dissous dans un milieu hypotonique (10 mM tampon phosphate, pH=7.4, 50 mM NaCl) ou 1.25 ml de diclofénac sodique utilisé comme référence à différentes concentrations (1, 2, 3 mg/ml). Le contrôle considéré comme le 100% d'hémolyse contient la suspension érythrocytaire avec le milieu hypotonique seul. Après incubation pendant 10 minutes à température ambiante, une centrifugation est effectuée à 3000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. L'absorbance du surnageant récupéré est mesurée à 540 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse est calculé selon la formule suivante :

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

A_C : absorbance du contrôle.

A_E : absorbance des échantillons.

II.4.2.3. Inhibition de la dénaturation des protéines

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits d'acétate éthyle et butanolique a été évaluée par la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines décrite par Sakat *et al.*, (2009). Brièvement, 500 µl de la solution d'albumine du sérum bovin (BSA) à 5 % préparée dans un tampon Tris-HCl (20 mM, pH=6.8) est ajoutée à 500 µl de chaque extrait à différentes concentrations (12.5, 37.25, 62.5 µg/ml) ou de diclofénac sodique comme anti-inflammatoire de référence avec les mêmes concentrations. Le contrôle est composé de 500 µl de la solution de BSA et 500 µl du tampon Tris-HCl. Après incubation pendant 20 min à 37°C, la température est augmentée à 70°C pendant 10 min, suivie d'un refroidissement. L'absorbance est mesurée à 660 nm et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé comme suit :

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

A_C : absorbance du contrôle.

A_E : absorbance des échantillons.

II.5. Activité antioxydante des extraits de *Helichrysum stoechas*

II.5.1. Activité antioxydante *in vivo*

L'activité antioxydante *in vivo* des extraits d'acétate éthyle et butanolique est déterminée selon la méthode décrite par Zhang *et al.*, (2003). Pratiquement, des lots de 7 souris ont été constitués. Les souris des groupes traités reçoivent quotidiennement par voie orale pendant 21 jours consécutifs, 75,150 et 300 mg/kg d'E.AE, d'E.But ou 150 mg/kg de l'acide ascorbique comme référence. Les souris du groupe témoin ont reçu uniquement du NaCl 0.9%. Au 22^{ème} jour, les souris sont sacrifiées et le foie est immédiatement récupéré, nettoyé avec du NaCl 0.9% stérile et froid.

Afin de doser les marqueurs du stress oxydatif (catalase, superoxyde dismutase, glutathion réduit et malondialdéhyde), un poids de 500 mg de foie est broyé dans 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. Le surnageant est aliquoté puis conservé à -32° C jusqu'à son utilisation.

II.5.1.1. Détermination de l'activité de la superoxyde dismutase

La détermination de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) est effectuée selon la technique décrite par Marklund et Marklund (1974). Le principe du dosage est basé sur une compétition entre la réaction d'auto-oxydation du pyrogallol par les radicaux $O_2^{\cdot-}$ et la dismutation de ces radicaux par la SOD. Brièvement, 25 μ l de surnageant sont ajoutés à 935 μ l de tampon constitué de 50 mM Tris et de 1 mM d'acide diéthylènetriamine-pentacétique (DTPA), le pH du tampon est amené entre 8.6 et 8.7 avec l'acide cacodilyque. Un volume de 40 μ l de pyrogallol (10 mM) préparé dans du HCl (0.01N) est ajouté au milieu réactionnel. Après homogénéisation, la lecture de l'absorbance est lancée 45 secondes après l'addition du pyrogallol à une longueur d'onde de 420 nm pendant 1 minute. L'activité de la SOD est exprimée en unité par milligramme de protéines 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.

$$\% \text{ d'inhibition} = (A_C - A_E / A_C)$$

A_C : absorbance du pyrogallol seul.

A_E : absorbance du pyrogallol en présence du surnageant du foie.

II.5.1.2. Détermination de l'activité de la catalase

L'activité enzymatique de la catalase a été déterminée selon la méthode décrite par Aebi *et al.*, (1974), dont le principe est basé sur la diminution de l'absorbance à 240 nm qui est due à la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de la catalase. Brièvement, 34 μ l de surnageant dilué au 1/10 sont ajoutés directement dans la cuve contenant 966 μ l de H_2O_2 (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 en utilisant un spectrophotomètre UV/VIS (SPECORD® 210 PLUS). L'activité de la catalase est exprimée en μ mol de H_2O_2 /min/mg de protéines.

II.5.1.3. Dosage de glutathion réduit

Le dosage de glutathion réduit (GSH) est effectué selon la méthode d'Ellman (1959), basée sur la réaction d'oxydation du GSH par l'acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) libérant ainsi l'acide thionitrobenzoïque (TNB) absorbant à 412 nm. A 200 μ l d'homogénat sont ajoutés 200 μ l de TCA à 10 %. Le mélange est agité pendant 5 min puis centrifugé à 2000 rpm pendant 10 min. Après centrifugation, 200 μ l de surnageant sont

mélangés avec 1.8 ml de DTNB à 0.6 mM préparé dans le tampon phosphate de sodium (0.2 M, pH 8). Après 5 min d'incubation, la lecture de l'absorbance s'effectue à 412 nm. La concentration du glutathion réduit est exprimée en nmol/mg de protéines.

II.5.1.4. Dosage du malondialdéhyde

Le dosage du MDA est réalisé selon le protocole décrit par Mihara et Uchiyama (1978). Un volume de 125 µl de surnageant de foie est ajouté à 125 µl de TCA (20%) et 250 µl de TBA (0.67%). Le mélange réactionnel est chauffé à 100 °C pendant 15 min. Après refroidissement rapide, 1 ml de *n*-butanol est ajouté. Le milieu réactionnel subit une forte agitation ensuite une centrifugation 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 est exprimée en nmol de MDA/mg de protéines.

II.5.2. Activité antioxydante *in vitro*

II.5.2.1. Piégeage du radical DPPH[•]

L'évaluation de l'activité antiradicalaire des extraits d'acétate éthylique et butanolique de *H. stoechas* vis-à-vis le radical DPPH est effectuée selon la méthode décrite par Que *et al.*, (2006). Un volume de 500 µl de la solution de DPPH (0.1 mM) est ajouté à 500 µl d'extrait à différentes concentrations (5 - 90 µg/ml). Le BHT est utilisée comme antioxydant standard. Le mélange réactionnel est incubé 30 min à l'obscurité et à température ambiante, puis l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = (A_C - A_T / A_C) \times 100$$

A_C : absorbance du contrôle.

A_T : absorbance du test.

La concentration ayant la capacité de piéger 50% du radical DPPH (IC₅₀) est déterminée.

II.5.2.2. Réduction du radical cation ABTS^{•+}

La capacité des extraits de *H. stoechas* à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} est évaluée selon la méthode décrite par Re *et al.*, (1999). Le radical cation ABTS^{•+} est produit par réaction d'ABTS (7 mM) et le persulfate de potassium (2.45 mM) à température ambiante et à l'obscurité pendant 16-18 heures. La solution d'ABTS^{•+} est diluée avec l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,020$ à 734 nm. Ensuite, 50 µl d'extrait ou d'antioxydant de référence (BHT) sont ajoutés à 1 ml de l'ABTS^{•+}. Après 6 min d'incubation à température

ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 734 nm. Le pourcentage d'activité antiradicalaire vis-à-vis des radicaux ABTS^{•+} est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = (A_C - A_T / A_C) \times 100$$

A_C : absorbance du contrôle.

A_T : absorbance du test.

II.5.2.3. Piégeage du radical hydroxyle

L'activité de piégeage du radical hydroxyle des extraits est mesurée selon la méthode de Sharma *et al.*, (2013). Pratiquement, 100 µl de différentes concentrations des extraits de *H. stoechas* ou l'acide ascorbique (standard) sont ajoutés à 500 µl de FeSO₄ (1.5 mM) et 350 µl de H₂O₂ (6 mM). Après 5 min d'incubation, 150 µl de salicylate de sodium (20 mM) sont additionnées au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laissé réagir pendant 1 h à température ambiante, et l'absorbance est mesurée à 562 nm. Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé selon la formule suivante :

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

A_0 : absorbance du contrôle.

A_1 : absorbance du test.

A_2 : absorbance du test (sans salicylate de sodium).

II.5.2.4. Piégeage de l'anion superoxyde

L'effet scavenger des extraits de *H. stoechas* vis-à-vis de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) est évalué en utilisant le système PMS-NADH-NBT selon le protocole décrit par Ani *et al.*, (2006). 50 µl de différentes concentrations d'extraits ou de l'acide gallique (standard) sont mélangées avec 500 µl de NADH (468 µM) et 500 µl de NBT (156 µM). Après 2 minutes d'incubation à température ambiante, 50 µl de PMS (60 µM) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laissé réagir pendant 5 minutes à température ambiante, et l'absorbance est mesurée à 560 nm. Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = (A_C - A_T / A_C) \times 100$$

A_C : absorbance du contrôle.

A_T : absorbance du test.

II.5.2.5. Piégeage du peroxyde d'hydrogène

La capacité des extraits de *H. stoechas* à piéger le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est évaluée selon la méthode décrite par Müller, (1985). Dans des puits d'une microplaque 96 puits, 20 µl de H₂O₂ (10 mM) sont mélangés avec 100 µl de tampon phosphate de sodium (0.1 M, pH 5) et 20 µl de différentes concentrations d'extraits ou de l'acide ascorbique (standard). Après 5 minutes d'incubation à 37°C, 30 µl d'ABTS (1.25 mM) et 30 µl de peroxydase (1 U/ml) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est ensuite bien agité et laissé réagir pendant 10 min à 37°C, avant la lecture de l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (Bio-TEK, ELX 800, USA). Le pourcentage de l'activité antiradicalaire est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = (A_C - A_T / A_C) \times 100$$

A_C : absorbance du contrôle.

A_T : absorbance du test.

II.5.2.6. Blanchiment du β-carotène

La capacité des extraits étudiés à prévenir le blanchiment du β-carotène est déterminée selon la méthode de Sevgi *et al.*, (2015) basée sur la capacité des extraits à inhiber la formation des hydroperoxydes diène conjugués durant l'oxydation de l'acide linoléique. Brièvement, 0.5 mg de β-carotène dans 1 ml de chloroforme est mélangé avec 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme sous vide à 45°C, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés au mélange qui sera vigoureusement agité. Le milieu réactionnel contient 2.5 ml de l'émulsion de β-carotène/acide linoléique et 0.5 ml d'extraits (2 mg/ml) ou de l'antioxydant de référence (BHT). Le mélange est placé dans un bain-marie et incubé à 50°C pendant 2 heures. L'oxydation de l'émulsion est suivie par la mesure de l'absorbance au temps zéro et après chaque 20 min pendant 2 h à 490 nm. L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = [(1 - (A_{t0} - A_{t120}) \text{ test} / (A_{t0} - A_{t120}) \text{ contrôle})] \times 100$$

II.5.2.7. Peroxydation de l'acide linoléique

L'activité antioxydante totale des extraits étudiés est déterminée selon la méthode de thiocyanate ferrique décrite par Gulcin *et al.*, (2005). Premièrement, une émulsion d'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). Le milieu réactionnel contient 600 µl de

solutions d'extraits ou de l'antioxydant standard (BHT) à une concentration bien définie (50 µg/ml) et 600 µl de l'émulsion d'acide linoléique. Le contrôle contient tous les réactifs sauf l'échantillon à tester (extraits ou antioxydant standard) qui est remplacé par un volume égal de la solution tampon. Après agitation, le mélange est incubé à 25°C à l'obscurité. La lecture est faite après 15 min d'incubation puis chaque 24 heures pendant 96 heures, en mélangeant 1 ml d'éthanol, 20 µl KCN, 20 µl d'échantillon et 20 µl de FeCl₂ et après 3 min, l'absorbance est lue à 500 nm contre un blanc d'éthanol. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition de la peroxydation (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

A_c : Absorbance du contrôle.

A_t : Absorbance du test.

II.5.2.8. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur des extraits de *H. stoechas* a été déterminé selon le protocole décrit par Rohit *et al.*, (2012). Des solutions d'extraits et d'antioxydant de référence (BHT) à différentes concentrations sont initialement mélangées avec 625 µl du tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 625 µl de K₃Fe(CN)₆ à 1%. Après 20 min d'incubation à 50°C suivie d'un refroidissement, 625 µl de TCA (10%) et 625 µl de FeCl₃ (0.1%) sont ajoutés au milieu réactionnel, et l'absorbance est lue à 700 nm contre un blanc sans FeCl₃. L'absorbance est directement proportionnelle au pouvoir réducteur. La valeur d'EC₅₀ est calculée à partir de la courbe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.

II.5.2.9. Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale des extraits de *H. stoechas* est estimée par dosage du phosphomolybdène selon la méthode décrite par Prieto *et al.*, (1999). Un volume de 100 µl des solutions d'extraits ou standard (acide ascorbique) est ajouté à 900 µl d'un réactif composé d'acide sulfurique (0.6 M), de phosphate de sodium (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM). Le mélange est incubé à 95° C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm. La capacité antioxydante totale est exprimée en microgramme d'équivalent d'acide ascorbique (Vc) par milligramme d'extrait (µg EVc/mg d'extrait), et calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (**figure 12**).

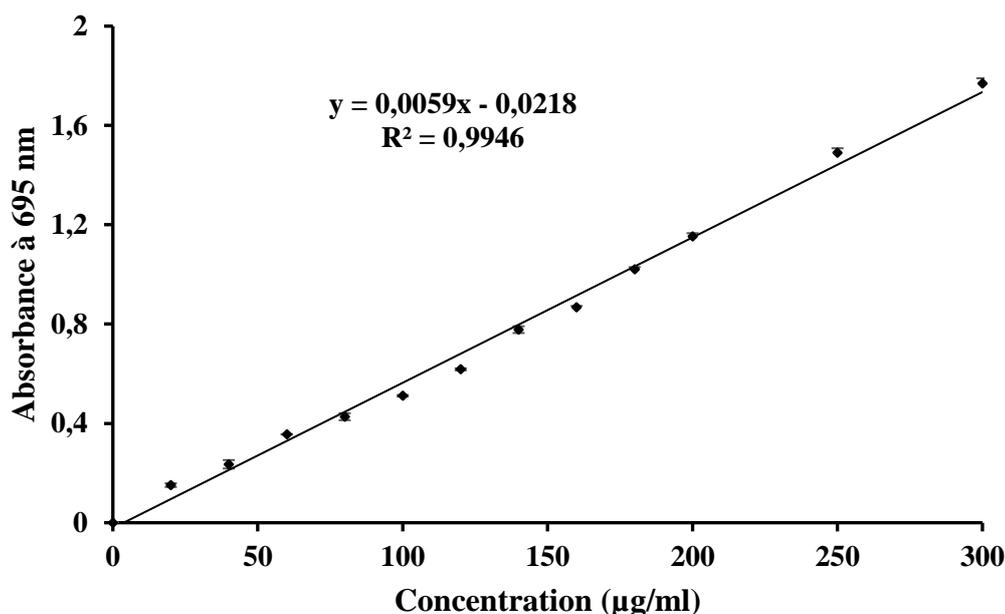


Figure 12. Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique

II.5.2.10. Activité anti-hémolytique

La capacité des extraits à inhiber l'hémolyse induite par les radicaux libres est évaluée selon la méthode décrite par Bouhlali *et al.*, (2016). Dans des puits d'une microplaque 96 puits, 120 µl de la suspension érythrocytaire diluée à 1% dans un tampon phosphate (10 mM, pH=7.4) sont mélangés avec 60 µl d'extraits ou de l'antioxydant de référence (Trolox) à différentes concentration (5-40 µg/ml). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 120 µl de AAPH (120 mM) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est incubé à 37 °C et l'absorbance est mesurée à 450 nm toutes les 10 min pendant 260 min à l'aide d'un lecteur de microplaque (Bio-TEK, ELX 800, USA). Les échantillons sont remplacés par une solution physiologique dans le contrôle négatif. L'effet protecteur des extraits envers l'hémolyse induite par des radicaux libres est estimé par la détermination du temps de demi-hémolyse (HT₅₀).

II.6. 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 7. 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
ET
DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Phytochimie des extraits de *H. stoechas*

La préparation des extraits a été effectuée en deux grandes étapes, la première a été faite par un mélange méthanol/eau (7/3 v.v) pour obtenir initialement l'extrait brut. Selon Mahmoudi *et al.* (2013), la macération semble être la meilleure méthode pour l'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes. L'extraction par le méthanol et l'eau ainsi que leur mélange à différents ratios permettent une bonne récupération de composés phénoliques (Barros *et al.*, 2010). La deuxième étape a été réalisée par deux solvants à polarité croissante à savoir l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol permettant ainsi de séparer des composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et selon leur degré de glycosylation (Chaouche *et al.*, 2016). Selon Liu *et al.* (2014), l'acétate d'éthyle est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes aglycones ou mono-*O*-glycosides et partiellement di-*O*-glycosides tandis que le *n*-butanol est utilisé pour l'extraction des flavonoïdes di-glycosides, tri-glycosides et C-glycosides.

Les extraits obtenus sont des fines poudres hygroscopiques de couleur marron foncée. Le rendement de l'extrait butanolique (6.10 %) est plus élevé que celui de l'extrait d'acétate éthyle (1.08 %). Ceci s'explique par le fait que les solvants utilisés possèdent des pouvoirs et des sélectivités d'extraction différents. Nos résultats concordent avec ceux présentés par Matić *et al.* (2013), sur *H. zivojinii* espèce du même genre que la nôtre.

La plante utilisée pour l'extraction a été séchée à l'ombre puis broyée. Le séchage à l'obscurité prévient les transformations chimiques telles que l'isomérisation et la dégradation causées par les radiations UV de la lumière solaire (Marston et Hostettmann, 2006). L'utilisation de la poudre plutôt que la plante non broyée améliore l'extraction en augmentant la surface de contact entre l'échantillon et le solvant, facilitant ainsi sa pénétration à l'intérieur des cellules (Jones et Kinghorn, 2005).

Les composés phénoliques (acides phénoliques et flavonoïdes) forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes, et sont connus pour leurs capacités antioxydantes et anti-inflammatoires (Chen *et al.*, 2019). Les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes ont été déterminées par dosage colorimétrique en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et du trichlorure d'aluminium respectivement. Ces deux méthodes sont considérées comme les meilleures méthodes de détermination des polyphénols et des

flavonoïdes des extraits de plantes, car elles sont standardisées, simples et reproductibles (Djeridane *et al.*, 2010).

Les résultats montrent que l'extrait d'acétate éthyle est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait butanolique (**tableau 3**). La concentration de ces composés dans les extraits de la plante dépend de la polarité des solvants utilisés dans la préparation des extraits (Aires et Carvalho, 2017). Il est souvent rapporté que les composés phénoliques sont abondants dans les espèces appartenant à la famille des Astéracées (Djeridane *et al.*, 2006). Toutefois, les conditions géographiques et climatiques peuvent entraîner des différences significatives dans les concentrations des composés bioactifs des plantes, ce qui se répercute sur leurs activités biologiques.

Tableau 3. Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits d'acétate éthyle (**E.AE**) et butanolique (**E.But**) de *H. stoechas*.

Extraits	Polyphénols (μg EAG / mg d'extrait)	Flavonoïdes (μg EQ / mg d'extrait)
E.AE	589.65 \pm 35.58	84.78 \pm 8.07
E.But	406.25 \pm 16.56	69.52 \pm 5.47

Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3).

Peu de travaux concernant les teneurs en composés phénoliques de l'espèce étudiée ont été réalisés. Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *H. stoechas* originaire de Libye ont été estimées à 8.07 ± 0.03 mg EAG/g MS et 2.04 ± 0.01 mg EC/g MS, respectivement par Ibrahim *et al.* (2017). Cependant, Boubakeur *et al.* (2017) ont montré que l'extrait éthanolique de la partie aérienne de *H. stoechas* possède des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes plus élevées que celles de l'extrait aqueux de la même plante. D'après Les *et al.* (2017), le contenu de polyphénols dans l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *H. stoechas* est estimé à 166.6 ± 20.1 μg EAG/mg d'extrait. La répartition inégale des composés phénoliques dans les différents organes d'une plante est rapporté par Brunet et Hoste (2006) et Falleh *et al.* (2011). Selon Haddouchi *et al.* (2014), les fleurs de *H. stoechas* sont plus riches en polyphénols et en flavonoïdes que les tiges feuillées.

D'autre part, les teneurs en composés phénoliques sont influencées par la technique d'extraction. En effet, l'extrait obtenue par extraction accélérée par solvant contient des taux plus élevés de polyphénols et de flavonoïdes par rapport à ceux obtenus par soxhlet, micro-onde, macération et sonication (Zengin *et al.*, 2020).

L'analyse des profils chromatographiques des extraits d'acétate éthylique et butanolique de *H. stoechas* obtenus par LC-ESI/MS, montre la présence de 9 acides phénoliques et 11 flavonoïdes (**figure 13**). L'acide férulique, l'isoquercétine, l'acide chlorogénique, l'acide ellagique, la quercétine, la quercétine 3-*O*-galactoside, la rutine, l'epicatéchine et le catéchol sont les composés majoritaires identifiés dans les deux extraits. Ils sont accompagnés d'autres constituants minoritaires tels que l'acide hydroxybenzoïque, le chlorure myrtilline, l'acide caféique et la cyanine chlorure (**tableau 4**). La teneur de l'E.AE en acides phénoliques et en flavonoïdes est plus importante que celle de l'E.But qui renferme juste l'epicatéchine, l'acide hydroxybenzoïque et la procyanidine B2 à des quantités plus élevées.

Nos résultats corroborent ceux de Lavault et Richomme (2004) qui ont montré que le *H. stoechas* variété *olonense* contient l'acide chlorogénique, l'acide caféique, la quercétine et l'isoquercétine. La majorité des composés détectés dans la présente étude ont été caractérisés par Zengin *et al.* (2020) dans l'extrait méthanolique de *H. stoechas* subsp. *barrelieri*, avec la prédominance de la quercétine. De même, l'acide hydroxybenzoïque, l'acide caféique et l'isoquercétine ont été identifiés dans l'extrait méthanolique de *H. stoechas* (Les *et al.*, 2017).

II. Toxicité des extraits de *Helichrysum stoechas*

L'étude de la toxicité aiguë d'un extrait ou d'une molécule est indispensable pour déterminer la DL₅₀ qui permet d'adapter le traitement aux limites. Dans notre étude, la ligne directrice de l'OCDE 425 a été suivie pour l'évaluation de la toxicité chez l'animal.

L'administration par voie orale de 2000 mg/kg de poids corporel (pc) des extraits de *H. stoechas* aux différents lots de souris n'a montré aucune mortalité, et aucun signe clinique de toxicité n'a été constatée durant les 14 jours d'observation. Ces extraits sont donc considérés comme non toxiques, avec une DL₅₀ supérieure à 2 000 mg/kg de pc. Concernant l'état général de l'animal, après observation, les extraits ne modifient pas le comportement des souris (mobilité, activité respiratoire, somnolence). Ils n'ont donc pas d'effets toxiques.

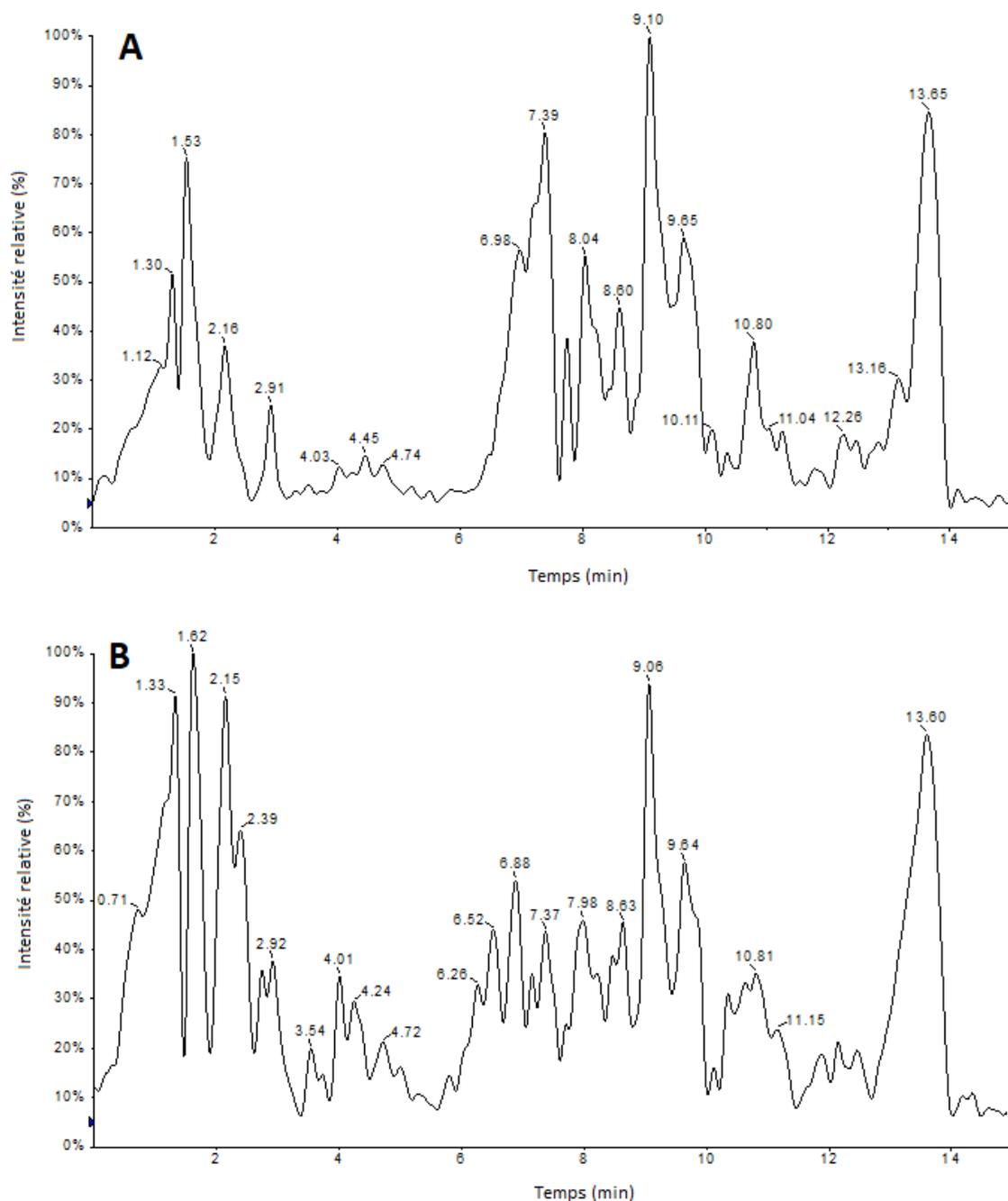


Figure 13. Profils chromatographiques de l'extrait d'acétate éthylique (**A**) et butanolique (**B**) de *H. stoechas* obtenus par LC-ESI/MS.

Dans la bibliographie consultée, aucune étude toxicologique sur le *H. stoechas* n'a été réalisée. En outre, très peu sont les travaux qui se sont consacrés à l'étude de la toxicité des espèces du même genre. Les extraits aqueux de trois espèces du genre *Helichrysum* (*H. arenarium*, *H. noeanum* et *H. pilicarum*) n'ont provoqué aucun changement clinique apparent chez les rats pendant les 24 h d'observation (Küpeli *et al.*, 2006).

Tableau 4. Composés phénoliques identifiés par LC-ESI/MS dans les extraits d'acétate éthylique (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas*.

Composés phénoliques	T _R	E.AE (µg/g extract)	E.But (µg/g extract)	SM [M-H] ⁻	M
Acide gallique	2.56	0.20	0.19	169.00	170.12
Catéchol	4.47	2.50	1.58	109.00	110.11
Acide vanillique	6.25	0.004	0.006	166.66	168.15
Procyanidine B2	6.32	-	0.008	577.10	578.52
Acide chlorogénique	6.55	10.60	3.79	353.16	354.31
Acide <i>p</i> -coumarique	6.62	0.10	0.10	162.76	164.16
Acide caféique	6.68	0.59	0.32	178.47	180.16
Acide hydroxybenzoïque	7.11	0.75	1.43	134.78	135.12
Chlorure myrtilline	7.34	0.75	0.32	462.18	500.80
Quercétine 3- <i>O</i> -galactoside	7.35	3.81	1.63	463.00	464.38
Rutine	7.82	3.78	2.70	609.42	610.52
Acide trans-cinnamaldéhyde	7.99	0.02	0.05	131.80	132.16
Acide férulique	8.24	13.60	1.20	192.81	194.18
Lutéoline	8.32	0.13	0.15	285.00	286.24
Cyanine chlorure	8.32	0.57	0.80	286.20	287.10
Acide ellagique	8.36	7.12	6.92	300.70	302.20
Quercétine	8.37	5.16	4.77	300.60	302.20
Epicatéchine	8.40	3.21	6.62	289.10	290.30
Apigénine	8.71	0.05	0.06	269.00	270.12
Isoquercétine	9.38	11.10	9.00	464.90	464.38

T_R : temps de rétention ; SM : spectroscopie de masse ; [M-H]⁻ : mode négatif ; M : masse moléculaire (g/mol).

III. Activité anti-inflammatoire des extraits de *H. stoechas*

Dans la présente étude, les propriétés anti-inflammatoires de *H. stoechas* ont été étudiées dans différents modèles d'inflammation *in vivo* et *in vitro*.

III. 1. Activité anti-inflammatoire *in vivo*

Le but de cette partie de l'étude est d'évaluer l'effet anti-inflammatoire des extraits étudiés chez la souris en utilisant deux modèles d'inflammation aiguë ; l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton et la poche d'air induite par la carragénine.

L'œdème induit par l'huile de croton est un modèle expérimental largement utilisé pour le criblage d'anti-inflammatoires de synthèse ou naturels qui agissent à différents stades de l'inflammation (Cabrini *et al.*, 2011). L'effet phlogogénique de l'huile de croton est dû principalement au principe actif 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) qu'elle contient. Le TPA induit une réaction inflammatoire caractérisée par une production importante de médiateurs pro-inflammatoires, une augmentation de la perméabilité vasculaire et un œdème.

Les résultats obtenus (**figure 14**) montrent que les souris du groupe témoin ont développé au bout de 6 heures un œdème d'oreille de $86 \pm 4.5 \mu\text{m}$. Le traitement des souris par 2 mg/oreille de E.AE et de E.But a induit une atténuation très significative ($p < 0.001$) de l'œdème, avec une épaisseur de $14 \pm 2.2 \mu\text{m}$ et $30 \pm 4.1 \mu\text{m}$ respectivement, ce qui correspond à des taux d'inhibition de 86 % et 64 % respectivement. Ces pourcentages d'inhibitions sont supérieurs à celui obtenu avec l'indométacine (53 %) utilisé comme anti-inflammatoire de référence.

L'important effet anti-inflammatoire des extraits étudiés est probablement dû à la présence de substances lipophiles douées d'activités anti-inflammatoires qui sont capables de traverser la barrière cutanée (Okoli *et al.*, 2007). Cette propriété anti-inflammatoire est liée au profil chimique de ces extraits qui sont particulièrement riches en composés bioactifs, principalement des acides phénoliques et des flavonoïdes. En effet, plusieurs acides phénoliques dont certains ont été identifiés dans cette étude tels que l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique, l'acide caféique, l'acide chlorogénique et l'acide ellagique ont une activité anti-inflammatoire très importante (Oliveira *et al.*, 2017 ; Fu *et al.*, 2020). De même, les flavonoïdes détectés dans la plante soient glycosylés ou non glycosylés comme la quercétine, l'isoquercétine, la quercétine 3-*O*-galactoside et la rutine préviennent significativement le développement de l'œdème de l'oreille induit chez la souris par l'huile de croton (Sosa *et al.*, 2007 ; Kim *et al.*, 2004). La réaction inflammatoire est déclenchée par l'activation de la protéine kinase C (PKC), qui favorise une augmentation de phospholipase A2 (PLA2) (Rahman *et al.*, 2011). Cette enzyme catalyse l'hydrolyse des phospholipides membranaires en acide arachidonique. L'oxydation enzymatique de ce dernier par les cyclo-oxygénases (COX) ou par les lipo-oxygénases (LOX) conduit à la formation des éicosanoïdes, prostaglandines, leucotriènes et cytokines (Oliveira *et al.*, 2013). De nombreux composés polyphénoliques sont doués d'activités anti-inflammatoire en inhibant les médiateurs inflammatoires. En effet, Chibli *et al.* (2014) affirment que la quercétine, la lutéoline et la rutine ont une activité inhibitrice de la PLA2, la COX et la LOX.

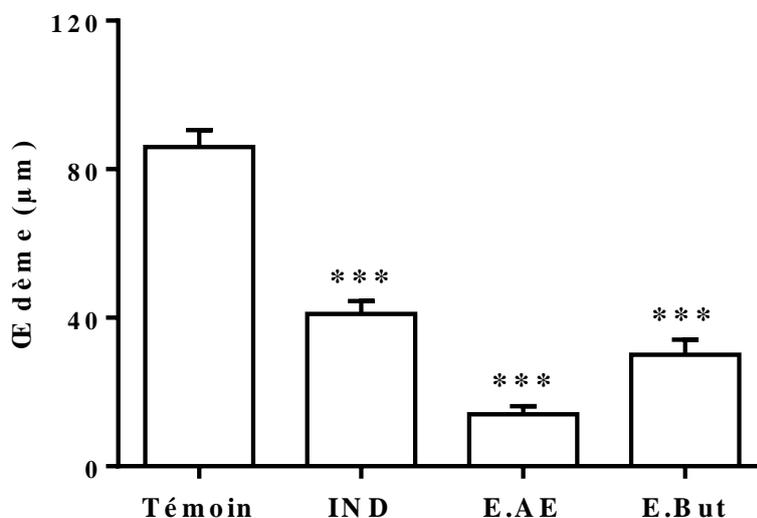


Figure 14. Effet des extraits de *H. stoechas* sur l'œdème de l'oreille induit par l'huile de croton chez la souris. L'œdème est induit par application topique de 80 µg d'huile de croton sur la face interne de l'oreille droite. Les souris sont traitées localement par 2 mg/oreille d'extrait d'acétate éthylique (**E.AE**) ou butanolique (**E.But**) ou par 0.5 mg/oreille d'indométacine (**IND**). Les souris du groupe témoin reçoivent uniquement l'huile de croton. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n = 7). *** : $p < 0.001$ vs témoin.

Pour confirmer l'activité anti-inflammatoire des extraits étudiés, leur effet est testé sur la migration des leucocytes vers le site inflammatoire. La poche d'air induite par la carragénine est bien connue pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de différents agents (Duarte *et al.*, 2012). La carragénine est un polysaccharide qui induit une migration leucocytaire via un mécanisme indirect qui implique l'activation des macrophages et la libération de cytokines pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 et le TNF- α (Kim *et al.*, 2017).

Quatre heures après l'injection de 0.1 ml de λ -carragénine dans la poche d'air, les souris du groupe témoin ont développés une inflammation aiguë caractérisée par une infiltration de $24.22 \pm 0.63 \times 10^6$ leucocytes/ml d'exsudat. Le traitement avec 1 mg/poche de E.AE ou de E.But réduit significativement ($p < 0.001$) le nombre de leucocytes infiltrés qui passe à $3.98 \pm 0.52 \times 10^6$ leucocytes/ml et $8.20 \pm 0.26 \times 10^6$ leucocytes/ml d'exsudat, respectivement. Ces valeurs correspondent à 84 % et 66 % d'inhibition par rapport au groupe témoin. Ces taux d'inhibition sont meilleurs que celui obtenu avec 0.1 mg/poche d'indométacine qui est de 58 % (**figure 15**).

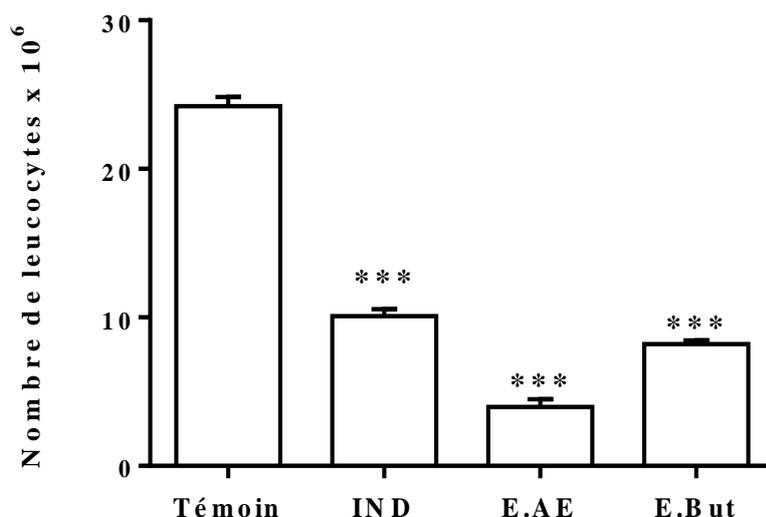


Figure 15. Effet des extraits de *H. stoechas* sur l’infiltration des leucocytes vers la poche d’air. L’inflammation est induite par l’injection de 0.1 ml de λ -carragénine (1%) dans la poche d’air. Une heure avant l’induction de l’inflammation, les souris sont traitées par 1 mg/poche de l’extrait d’acétate éthyle (**E.AE**) ou butanolique (**E.But**) ou par 0.1 mg/poche d’indométacine (**IND**). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n = 7). *** : $p < 0.001$ vs témoin.

La présence des composés doués d’activité anti-inflammatoire comme les acides phénoliques et des flavonoïdes dans les extraits de *H. stoechas* peuvent contribuer à cet effet. Ces composés inhibent la migration des leucocytes en bloquant leur adhésion à la paroi vasculaire. Cet effet serait dû à l’inhibition de la synthèse de l’IL-1 et le TNF- α , principaux inducteurs de l’expression des molécules adhésives sur la paroi vasculaire. En effet, l’acide gallique et l’acide ellagique ont montré un effet inhibiteur sur les prostaglandines et le TNF- α (Seo *et al.*, 2016). Il est rapporté que l’acide *p*-coumarique, identifié dans la plante, montre aussi un effet anti-inflammatoire en inhibant l’expression de la iNOS et la COX2 (Yoon *et al.*, 2014). Selon Mao *et al.* (2017), la quercétine a une activité inhibitrice de la production de NO et de TNF- α . Les travaux de Kim *et al.* (2019) sur l’extrait éthanolique de *H. bracteatum* ont montré aussi que cet extrait inhibe l’expression de la COX-2 et la production de NO et de TNF- α .

III. 2. Activité anti-inflammatoire *in vitro*

Les cytokines sont produites et libérées par les cellules gliales et les cellules du système immunitaire dans le but de transmettre des messages d’activation, d’inhibition, de chimioattraction et d’apoptose (Murtaugh, 1994). Parmi ces interleukines on trouve l’IL-10 qui est

une cytokine anti-inflammatoire produite par les monocytes activés. Elle est impliquée dans la fonction d'un certain nombre de cellules et influence de nombreux processus physiologiques, notamment l'angiogenèse, la genèse des tumeurs et les infections (Norian *et al.*, 2015). L'IL-17 est une cytokine récemment décrite, produite exclusivement par les CD4⁺ lors de leur activation, agissant le plus souvent comme une cytokine pro-inflammatoire qui stimule la libération des cytokines et des chimiokines secondaires. L'IL-17 induit le recrutement des neutrophiles pour des effets antimicrobiens (Norian *et al.*, 2015).

Afin d'examiner l'effet de *H. stoechas* sur la production des cytokines (IL-10 et IL-17A), les monocytes ont été stimulés avec la Con A en présence des deux extraits de *H. stoechas* à différentes concentrations. La Con A est un mitogène d'origine végétale utilisé le plus souvent pour induire la prolifération et la différenciation des leucocytes (Zhang *et al.*, 2011).

Les résultats obtenus montrent que la stimulation des monocytes par la Con A induit une production relativement faible de l'IL-10 (2.60 ± 0.63 pg/ml). Le traitement des cellules avec des différentes concentrations (1-100 µg/ml) des extraits de *H. stoechas* montre une augmentation significative de la production de cette cytokine. L'effet de l'E.But est plus fort que celui de l'E.AE. La meilleure valeur (25 ± 0.41 pg/ml) a été obtenue avec 10 µg/ml de l'E.But (**figure 16**).

La Con A stimule également la production de l'IL-17A par les monocytes (2.80 ± 0.06 pg/ml). La sécrétion de l'IL-17A par ces cellules est significativement diminuée sous l'effet des concentrations 10 et 100 µg/ml de l'E.AE et de la concentration 50 µg/ml de l'E.But. La meilleure inhibition (15.42 ± 1.48 %) est obtenue avec 50 µg/ml de l'E.But (**figure 17**).

L'activité anti-inflammatoire des extraits est due à la présence de certains composés bioactifs. En effet, les acides phénoliques détectés dans les extraits de la plante étudiée comme l'acide chlorogénique, l'acide férulique et l'acide ellagique ont montré des capacités à augmenter la production de l'IL-10 (Júlio de Souza *et al.*, 2020). De même, Keirns *et al.* (2020) ont prouvé que l'acide caféique et l'acide gallique réduisent significativement l'expression de l'IL-17 et induisent l'expression de l'IL-10 dans le côlon. Moutia *et al.* (2016) ont prouvé que la rutine inhibe la production de l'IL-17.

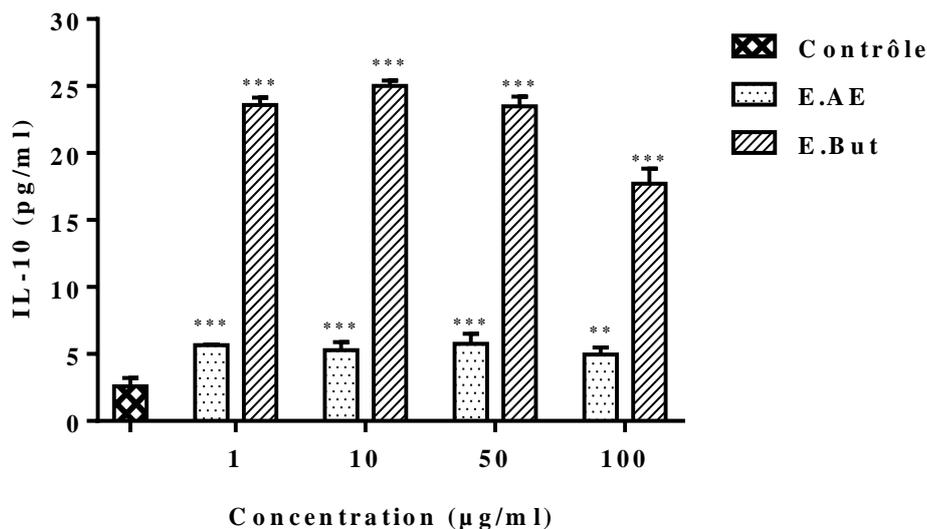


Figure 16. Effet des extraits de *H. stoechas* sur la production de l'IL-10. Les monocytes (2×10^5 cellules/ml) traitées par différentes concentrations (1, 10, 50 et 100 µg/ml) des extraits d'acétate éthylique (E.AE) ou butanolique (E.But) et stimulées par 5 µg/ml de concanavaline A sont incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant une nuit. Après centrifugation, le surnageant est récolté afin de doser l'IL-10 par ELISA. Les valeurs présentent la moyenne \pm SD (n = 3). *** : $p < 0.001$ vs contrôle.

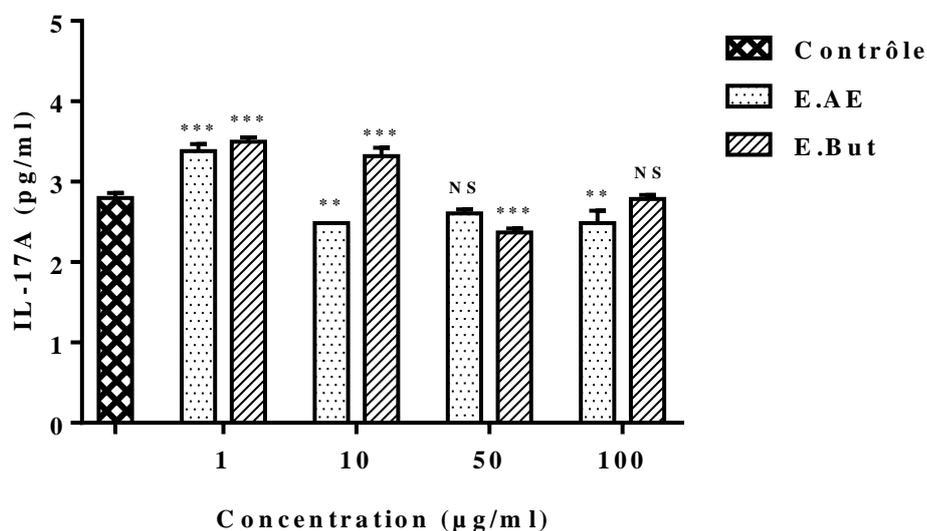


Figure 17. Effet des extraits de *H. stoechas* sur la production de l'IL-17A. Les monocytes (2×10^5 cellules/ml) traitées par différentes concentrations (1, 10, 50 et 100 µg/ml) des extraits d'acétate éthylique (E.AE) ou butanolique (E.But) et stimulées par 5 µg/ml de concanavaline A sont incubées à 37°C et 5% de CO₂ pendant une nuit. Après centrifugation, le surnageant est récolté afin de doser l'IL-17A par ELISA. Les valeurs présentent la moyenne \pm SD (n = 3). *** : $p < 0.001$ vs contrôle.

La stabilisation de la membrane lysosomiale est importante pour freiner la réponse inflammatoire en empêchant la libération de constituants lysosomiques des neutrophiles activés tels que les protéases qui provoquent une inflammation des tissus et d'autres dommages lors de leurs libération extracellulaire (Lima *et al.*, 2013). La méthode de stabilisation membranaire des érythrocytes a été choisie pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits de *H. stoechas in vitro* car la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale et sa stabilisation implique que les extraits peuvent ainsi stabiliser les membranes lysosomales (Mounnissamy *et al.*, 2007). L'hémolyse induite par l'hypotonie pourrait découler de la lyse des cellules en raison de la perte de pression osmotique du liquide intracellulaire et des composants électrolytiques (Anosike *et al.*, 2012). Plusieurs anti-inflammatoires non stéroïdiens exercent leurs effets soit en stabilisant la membrane lysosomale, soit en inhibant la libération d'enzymes lysosomiales (Sumathi et Anuradha, 2016).

Le traitement avec différentes concentrations (1-3 mg/ml) des extraits de *H. stoechas* protège les érythrocytes humains contre l'hémolyse de manière concentration dépendante. A 3 mg/ml, l'E.AE et l'E.But inhibent la lyse de la membrane érythrocytaire induite par la solution hypotonique avec des pourcentages d'inhibition de 90% et 98%, respectivement. L'effet inhibiteur de l'E.But est statistiquement similaire à celui du diclofénac (98 %), tandis que l'E.AE exerce un effet un peu plus faible que celui de l'E.But (**figure 18**).

Plusieurs études ont montré l'effet anti-hémolytique de différents extraits de plantes médicinales (Debnath *et al.*, 2013 ; Bouhlali *et al.*, 2016 ; Hmidani *et al.*, 2019). Cette activité est attribuée aux métabolites secondaires de ces plantes comme les flavonoïdes et les acides phénoliques qui ont la capacité de se lier à la composante membranaire et la protège contre les agents délétères (Tarahovsky *et al.*, 2014). En effet, Bouhlali *et al.* (2016), ont démontré la capacité de l'acide caféique, l'acide férulique, la quercétine et la lutéoline à stabiliser la membrane des globules rouges.

La dénaturation protéique est un processus dans lequel la protéine perd sa structure tertiaire et/ou secondaire suite à son exposition à la chaleur, à un agent infectieux ou chimique, induisant la rupture des liaisons électrostatiques, hydrogènes, hydrophobes et des ponts disulfures qui maintiennent la structure tridimensionnelle des protéines (Madan *et al.*, 2011). La plupart des protéines perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées (Marliyah et Ananthi, 2015). La dénaturation des protéines est une cause de l'inflammation qui est bien documentée, elle peut être à l'origine de la production d'auto-antigènes dans

certaines maladies auto-immunes telles que l'arthrite (Chatterjee *et al.*, 2012). La dénaturation des protéines induite thermiquement pourrait être inhibée par plusieurs anti-inflammatoires (Deattu *et al.*, 2012).

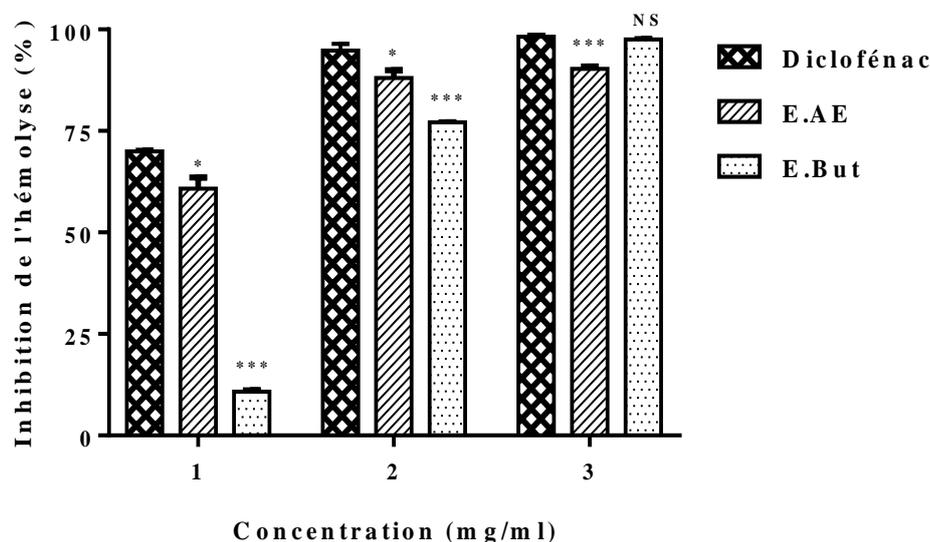


Figure 18. Effet de l'extrait d'acétate éthylique (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas* sur la lyse des érythrocytes humains induite par un milieu hypotonique. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3). ***: $p < 0.001$; *: $p < 0,05$; NS : non significatif vs diclofénac.

Les résultats du présent travail montrent que l'E.AE et l'E.But de *H. stoechas* inhibent d'une manière concentration dépendante la dénaturation de BSA et présentent une importante inhibition avec des IC_{50} de l'ordre de $101.20 \pm 4.17 \mu\text{g/ml}$ et $93.79 \pm 0.76 \mu\text{g/ml}$, respectivement. Ces valeurs sont faibles par rapport à celle obtenue avec le diclofénac sodique ($IC_{50} = 35.46 \pm 0.96 \mu\text{g/ml}$), utilisé comme anti-inflammatoire de référence (**figure 19**).

Selon l'étude effectuée par Vachali *et al.* (2004) sur l'interaction des flavonoïdes avec l'albumine sérique humaine, cette dernière possède une forte affinité pour la quercétine et la lutéoline, ce qui pourrait expliquer l'activité protectrice des polyphénols contre la dénaturation thermique de l'albumine.

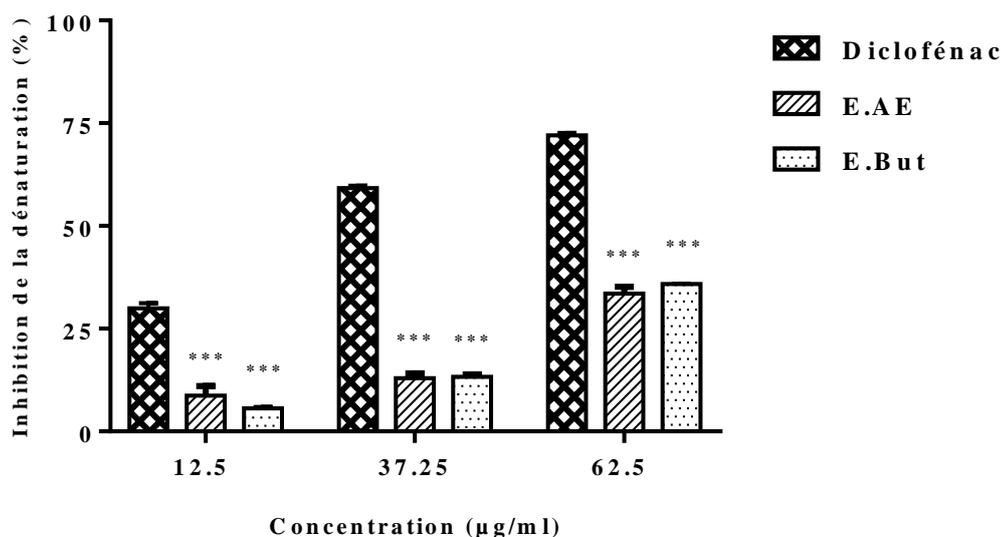


Figure 19. Effet de l'extrait d'acétate éthylique (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas* sur la dénaturation de BSA. Les valeurs représentent la moyenne \pm SD (n=3). ***: $p < 0.001$ vs dicloféna c.

IV. Activité antioxydante des extraits de *Helichrysum stoechas*

IV.1. Activité antioxydante *in vivo*

Les antioxydants limitent les effets des molécules oxydantes dans les tissus et jouent un rôle dans la défense contre les dommages oxydatifs cellulaires étant piègeurs des ROS. La superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion réduit constituent mutuellement une équipe de soutien de défense contre les ROS (Migdal et Serres, 2011). Cependant, ces processus de défense ne sont pas complètement efficaces s'ils ne sont pas renforcés par le pouvoir antioxydant des principes actifs des plantes. Une bonne partie des ROS est donc neutralisée par des antioxydants exogènes présents dans les plantes (Chandan *et al.*, 2007 ; Raja *et al.*, 2007). Pour cette raison notre étude sur la capacité antioxydante des extraits de *H. stoechas* s'est étalée à l'étude de l'évaluation des taux des paramètres du potentiel antioxydant au niveau du tissu hépatique.

Les résultats consignés dans le **tableau 5**, montrent les effets de l'E.AE et de l'E.But sur la catalase, la superoxyde dismutase, le glutathion réduit et le malondialdéhyde du foie de souris.

Tableau 5. Effet de l'extrait d'acétate éthylique (**E.AE**) et butanolique (**E.But**) de *H. stoechas* sur la catalase, SOD, GSH et MDA du surnageant du foie de souris.

Traitement des animaux	Catalase μmol/min/mg de protéines	SOD U/mg de protéines	GSH nmol/mg de protéines	MDA nmol/mg de protéines
Contrôle	216.28 ± 4.16	67.66 ± 6.71	58.53 ± 8.00	23.63 ± 3.07
Acide ascorbique				
150 mg/kg	261.88 ± 5.87	300.48 ± 9.19 ^{***}	81.82 ± 13.30	26.61 ± 1.08
E.AE				
75 mg/kg	328.22 ± 34.29 ^{**}	440.21 ± 9.73 ^{***}	28.96 ± 1.56	31.97 ± 1.56
150 mg/kg	330.82 ± 15.06 ^{***}	387.24 ± 14.20 ^{***}	57.74 ± 5.54	18.79 ± 1.85
300 mg/kg	255.68 ± 17.75	356.14 ± 11.64 ^{***}	64.48 ± 10.64	25.62 ± 0.80
E.But				
75 mg/kg	422.94 ± 21.39 ^{***}	433.33 ± 16.22 ^{***}	61.90 ± 2.92	18.63 ± 2.19
150 mg/kg	376.38 ± 21.19 ^{***}	321.56 ± 20.97 ^{***}	55.18 ± 1.97	15.91 ± 1.14 [*]
300 mg/kg	383.80 ± 15.28 ^{***}	360.42 ± 11.73 ^{***}	39.58 ± 1.97	18.56 ± 2.17

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n=7). ^{***}: $p < 0.001$; ^{**}: $p < 0,01$; ^{*}: $p < 0,05$ vs témoin.

La superoxyde dismutase inactive l'O₂^{•-} en le transformant en H₂O₂. Celui-ci est ensuite rapidement catabolisé par la catalase et les peroxydases en O₂ et H₂O. Ainsi, différentes études ont confirmé que la production de H₂O₂ sous l'action de la SOD est bien le facteur déclenchant des mécanismes naturels de défenses antioxydantes. La SOD apparaît donc comme l'enzyme clé de la défense naturelle contre les radicaux libres (Menvielle-Bourg, 2005).

Les valeurs de l'activité de la SOD évaluée chez tous les animaux expérimentaux sont présentées dans la **figure 20**. L'activité de la superoxyde dismutase chez les souris du groupe témoin est de 67.66 ± 6.71 U/mg de protéines. Le prétraitement avec les extraits de *H. stoechas* (75, 150 et 300 mg/kg) augmente significativement ($p < 0.001$) l'activité de la SOD en comparaison avec le groupe témoin. Les taux d'augmentation de l'activité induits par les

deux extraits sont assez proches et varient entre 78.96 % et 84.63 %. Ces activités sont meilleures que celle de l'acide ascorbique.

L'activité des SOD doit être couplée à une activité suffisante de la catalase ou de la GPx, sinon il s'en suivra une production nette d' H_2O_2 qui, en présence de métaux de transition, pourra donner naissance au puissant oxydant qu'est le radical hydroxyle et pour lequel il n'y a aucun mécanisme de détoxification enzymatique (Limón-Pacheco et Gonsebatt, 2009).

L'effet des différentes doses des extraits de *H. stoechas* sur l'activité de la catalase est représenté dans la **figure 21**. Les résultats obtenus révèlent que l'activité de la catalase chez les souris du groupe témoin est de 216.28 ± 4.16 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines. Le prétraitement avec les extraits de *H. stoechas* (75, 150 et 300 mg/kg) augmente significativement ($p < 0.01$; $p < 0.001$) l'activité de cette enzyme par rapport au groupe témoin. Le meilleur taux d'augmentation est celui obtenu avec l'E.But (48.86%) à 75 mg/kg. l'E.AE à 150 mg/kg exerce aussi un effet puissant de 34.62%. Ces effets sont meilleurs que celui de l'acide ascorbique à 150 mg/kg.

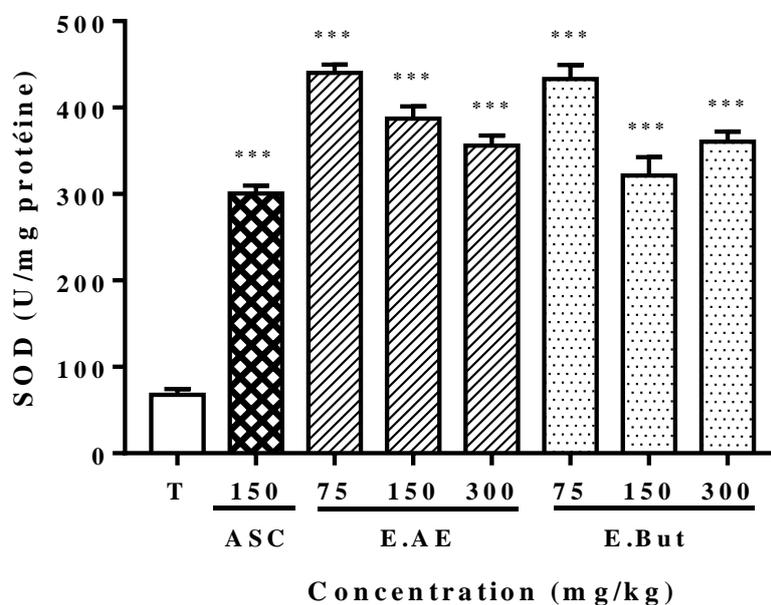


Figure 20. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas* sur l'activité de la superoxyde dismutase. Les souris sont prétraitées oralement soit avec 75,150 et 300 mg/kg d'E.AE, d'E.But ou 150 mg/kg d'acide ascorbique (ASC) ou avec du NaCl 0.9% (T). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n=7). ***: $p < 0.001$ vs témoin.

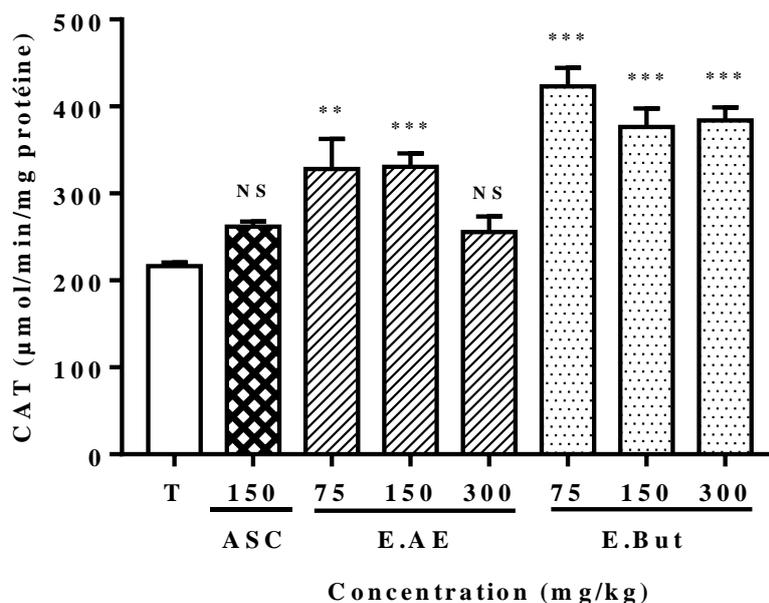


Figure 21. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (**E.AE**) et butanolique (**E.But**) de *H. stoechas* sur l'activité de la catalase. Les souris sont prétraitées oralement soit avec 75,150 et 300 mg/kg d'**E.AE**, d'**E.But** ou 150 mg/kg d'acide ascorbique (**ASC**) ou avec du NaCl 0.9% (**T**). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n=7). ***: $p < 0.001$; **: $p < 0,01$; NS : non significatif vs témoin.

La cellule dispose pour sa protection d'un premier système antioxydant de défense, le GSH porteur d'une fonction sulfhydryle (-SH). Le groupement -SH libre, lui permet de se lier aux métabolites toxiques. Le GSH joue son rôle antioxydant également en synergie avec les enzymes antioxydantes telles la CAT, la GPx et la SOD (Kehili *et al.*, 2017).

Nos résultats révèlent que le taux du GSH chez les souris du groupe témoin est de 58.53 ± 8.00 nmol/mg de protéines. Aucune variation significative de GSH n'est constatée chez les souris prétraités par les extraits de *H. stoechas* à différentes doses (75, 150 et 300 mg/kg) (**figure 22**).

La peroxydation lipidique est l'effet le plus anciennement connu des radicaux libres et le plus simple à mesurer, les dérivés de l'oxydation lipidique notamment le MDA sont les composés les plus souvent étudiés lorsqu'on recherche un stress oxydant (Misra *et al.*, 2009).

Dans cette étude, l'effet des extraits de *H. stoechas* sur le taux du malondialdéhyde est représenté dans la **figure 23**. Les résultats obtenus montrent que le taux du MDA chez les souris du groupe témoin est de 23.63 ± 3.07 nmol/mg de protéines. Seul le prétraitement avec 150 mg/kg de E.But réduit significativement ($p < 0.05$) le taux du MDA en comparaison avec le groupe témoin.

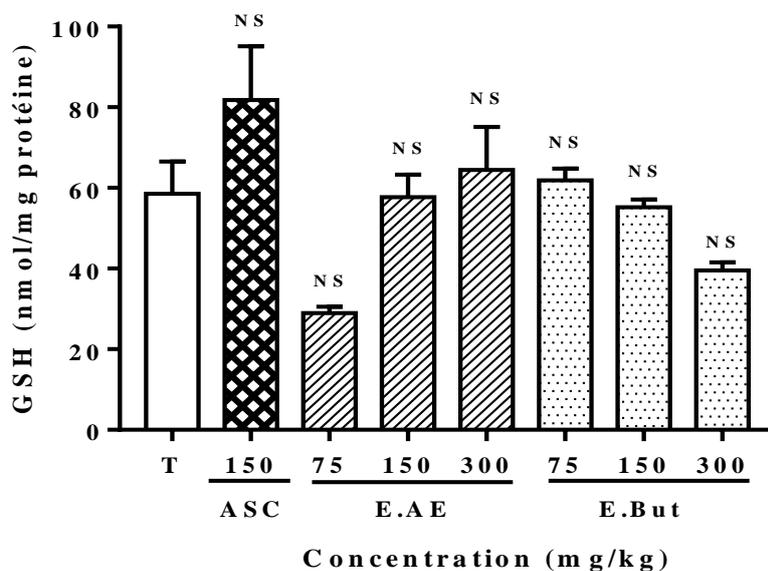


Figure 22. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (**E.AE**) et butanolique (**E.But**) de *H. stoechas* sur le taux du glutathion réduit. Les souris sont prétraitées oralement soit avec 75,150 et 300 mg/kg d'**E.AE**, d'**E.But** ou 150 mg/kg d'acide ascorbique (**ASC**) ou avec du NaCl 0.9% (**T**). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n=7). NS : non significatif vs témoin.

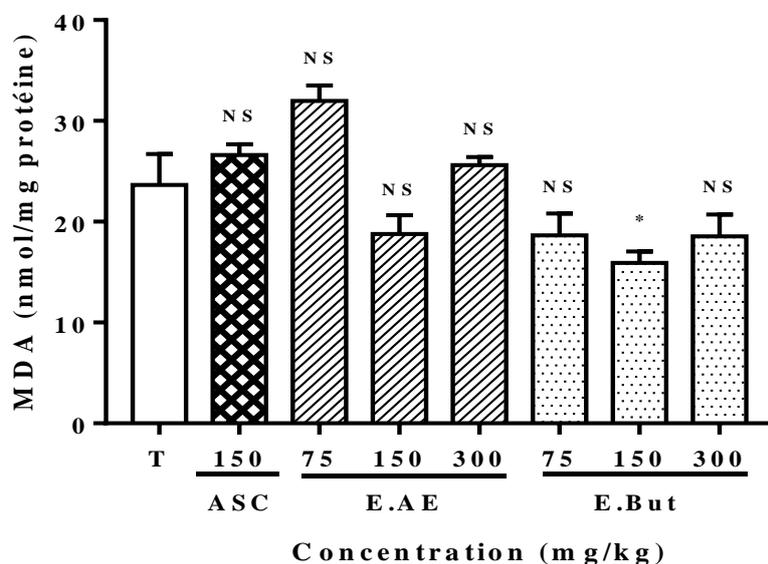


Figure 23. Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle (**E.AE**) et butanolique (**E.But**) de *H. stoechas* sur le taux du malondialdéhyde. Les souris sont prétraitées oralement soit avec 75,150 et 300 mg/kg d'**E.AE**, d'**E.But** ou 150 mg/kg d'acide ascorbique (**ASC**) ou avec du NaCl 0.9% (**T**). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM (n=7). *: $p < 0,05$; NS : non significatif vs témoin.

Nos résultats corroborent avec ceux de Apaydin Yildirim *et al.* (2017) qui ont montré que le traitement des rats avec l'extrait éthanolique de *Helichrysum plicatum* provoque une augmentation de l'activité des enzymes antioxydants (SOD et CAT), et par ailleurs une diminution des taux du MDA. La capacité des extraits de *H. stoechas* à stimuler la résistance au stress oxydatif en diminuant les taux du MDA et en augmentant l'activité enzymatique de la CAT et la SOD est attribuée à la richesse de cette plante en composés bioactifs. En effet, l'étude de Magalingam *et al.* (2016) a montré que la rutine et l'isoquercétine réduisent l'effet du stress oxydatif en minimisant le processus de peroxydation lipidique (MDA) d'une part et en améliorant l'activité de la CAT et la SOD d'autre part.

IV.2. Activité antioxydante *in vitro*

IV.2.1. Activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire des extraits de *H. stoechas* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par le passage de la couleur violette à la couleur jaune.

Les résultats de la **figure 24** montrent que les extraits d'acétate d'éthyle et butanolique de *H. stoechas* possèdent un effet piègeur remarquable vis-à-vis du radical DPPH^{*}. Les profils obtenus révèlent que les extraits étudiés ont une activité antiradicalaire concentration dépendante. En effet, à la concentration de 50 µg/ml, l'E.AE et l'E.But exercent une activité significative de piégeage du radical DPPH^{*} avec des taux de 93.68 % et 89.84 %, respectivement. L'E.AE représente l'extrait le plus actif avec une IC₅₀ de l'ordre de 5.07 ± 0.36 µg/ml, cette valeur est meilleure que celle obtenue avec le BHT (IC₅₀ = 7.84 ± 0.65 µg/ml). L'E.But a une IC₅₀ de 22.64 ± 1.61 µg/ml.

Les deux extraits ont montré une forte activité antiradicalaire avec des IC₅₀ très faibles. La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus avec d'autres extraits de la même espèce montre qu'ils sont similaires à ceux obtenus par Haddouchi *et al.* (2014) avec 6.57 µg/ml pour l'extrait méthanolique des fleurs et 8.72 µg/ml pour l'extrait méthanolique des tiges feuillées. Les IC₅₀ déterminées par Boubakeur *et al.* (2017) de l'extrait éthanolique (27.13 µg/ml) et de l'extrait aqueux (32.31 µg/ml) de *H. stoechas*, sont nettement supérieurs à nos résultats. De même, Barroso *et al.* (2014) montrent que l'extrait méthanolique (36.62 µg/ml) est plus actif que l'extrait aqueux (435.20 µg/ml) de l'espèce *H. stoechas*. Albayrak *et al.*, (2010) ont également montré que l'extrait méthanolique de *H. stoechas* est le meilleur

piégeur du radical DPPH ($IC_{50} = 7.75 \mu\text{g/ml}$) en comparaison aux autres espèces étudiées du genre *Helichrysum*.

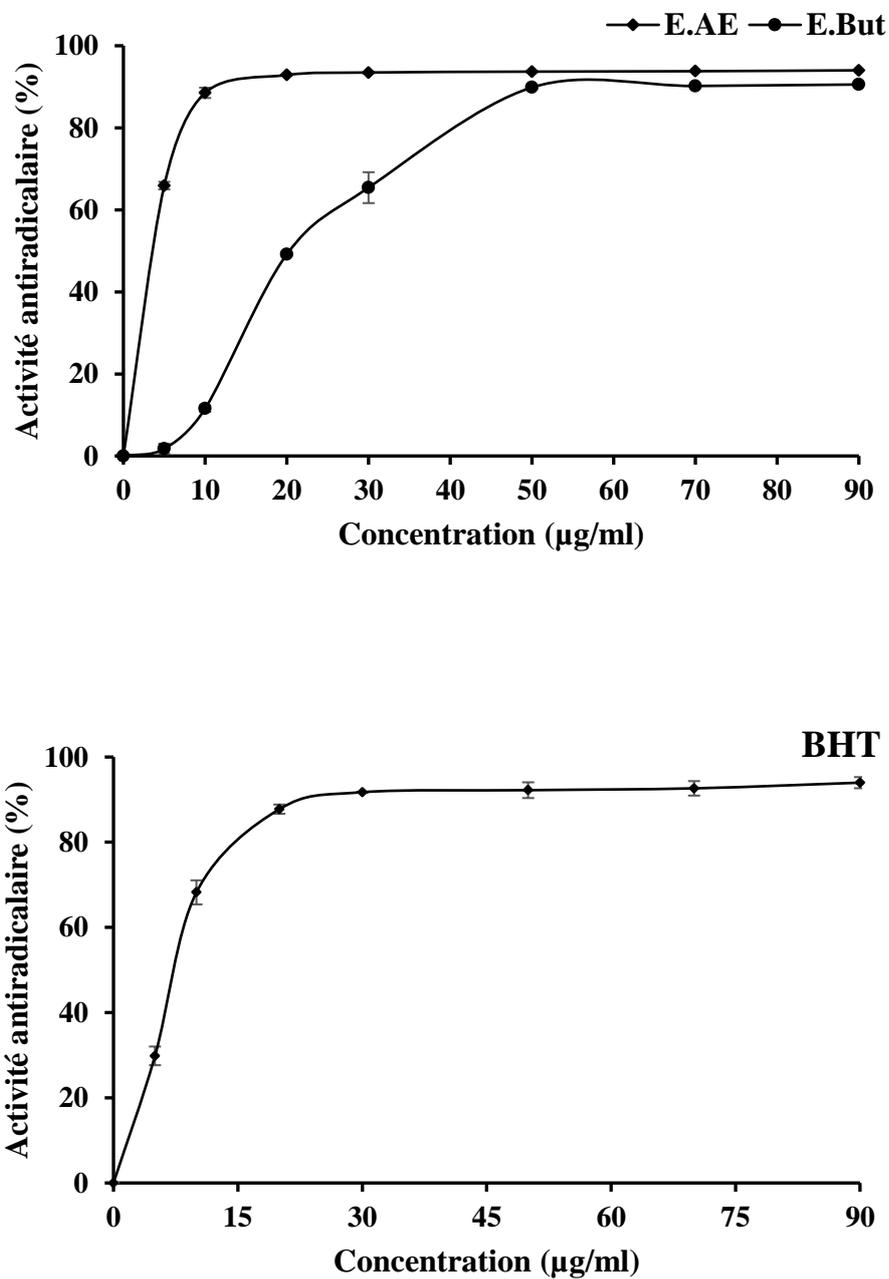


Figure 24. Activité antiradicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas* et du BHT vis-à-vis du radical DPPH'. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

L'activité antiradicalaire des extraits étudiés est en corrélation avec les teneurs en composés phénoliques (flavonoïdes et polyphénols). Ces derniers peuvent être responsables de cette activité et ont la capacité à céder un proton pour réduire le DPPH[•] (Sokół-Łętowska *et al.*, 2007).

La capacité antiradicalaire des extraits étudiés a été confirmée par le test ABTS qui est largement utilisé pour mesurer l'activité antiradicalaire des extraits de plantes. Ce test est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical cationique ABTS^{•+}, par transfert d'un électron (Olszowy et widowicz, 2016).

Les extraits de *H. stoechas* ont montré une activité antiradicalaire concentration dépendante vis-à-vis des radicaux ABTS^{•+} (**figure 25**). L'E.AE à la concentration de 10 µg/ml inhibe 99.15 % des radicaux ABTS^{•+} alors qu'avec cette même concentration, l'E.But en inhibe 64.19 %. En effet, l'E.AE présente une forte activité antiradicalaire avec une IC₅₀ égale à 4.08 ± 0.06 µg/ml en comparaison avec l'E.But qui présente une IC₅₀ égale à 10.11 ± 0.44 µg/ml, toutefois les deux extraits ont une efficacité moindre par rapport à celle du BHT (IC₅₀ = 3.37 ± 0.02 µg/ml).

D'après ces résultats, l'extrait qui présente une forte activité antiradicalaire est celui qui possède une teneur élevée en polyphénols. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Haddouchi *et al.* (2014) qui ont rapporté une corrélation significative entre la teneur en polyphénols et l'effet scavenger des extraits de *H. stoechas* et les résultats de Gouveia-Figueira *et al.* (2014) sur des extraits de *H. melaleucum*. De plus, Taşkın *et al.* (2020) ont montré que l'effet piègeur des extraits de *H. plicatum* envers le radical ABTS^{•+} varie considérablement en fonction du solvant et de la technique d'extraction. L'analyse chimique des extraits de *H. stoechas* a montré une richesse en acide chlorogénique et en acide caféique. Ces derniers sont des acides phénoliques qui ont la capacité de piéger le radical ABTS^{•+} (Zengin *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2017).

Le radical hydroxyle, le plus toxique des radicaux libres, est principalement responsable de la réactivité des ROS avec les molécules biologiques. L'inhibition de ce radical est cruciale dans la prévention des maladies induites par le stress oxydant (Gardès-Albert *et al.*, 2003).

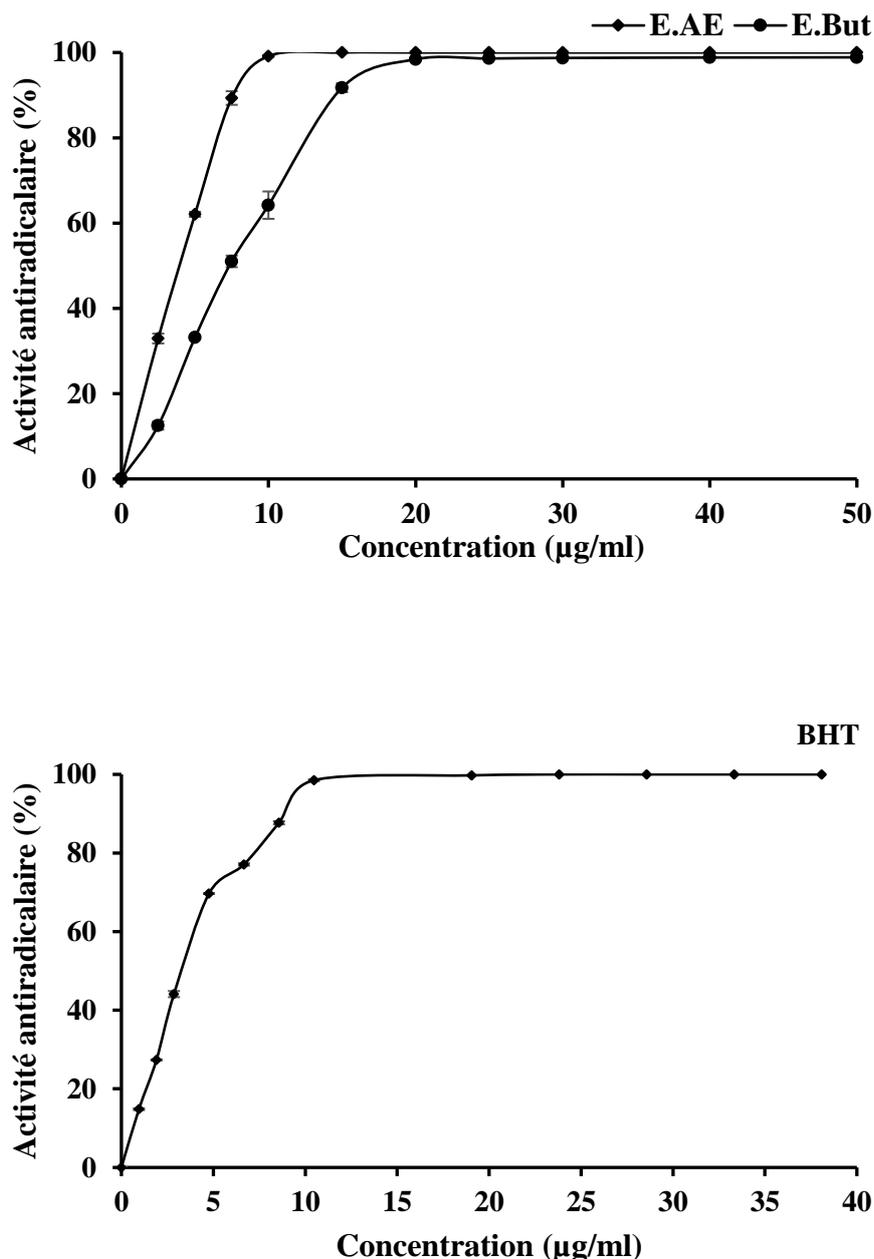


Figure 25. Activité antiradicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle (**E.AE**) et butanolique (**E.But**) de *H. stoechas* et du **BHT** vis-à-vis du radical $ABTS^{\bullet+}$. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits de *H. stoechas* piègent le radical hydroxyle d'une manière concentration dépendante (**figure 26**). A 350 µg/ml, l'E.AE et l'E.But montrent un effet piègeur de 68.61 % et 59.86 % respectivement. Ainsi, l'E.AE présente une IC_{50} de 179.31 ± 2.01 µg/ml qui correspond à une capacité de piégeage plus efficace par rapport à celle de l'E.But ($IC_{50} = 263.88 \pm 4.59$ µg/ml) suivie par l'acide ascorbique ($IC_{50} = 290.99 \pm 0.36$ µg/ml) utilisé comme antioxydant de référence.

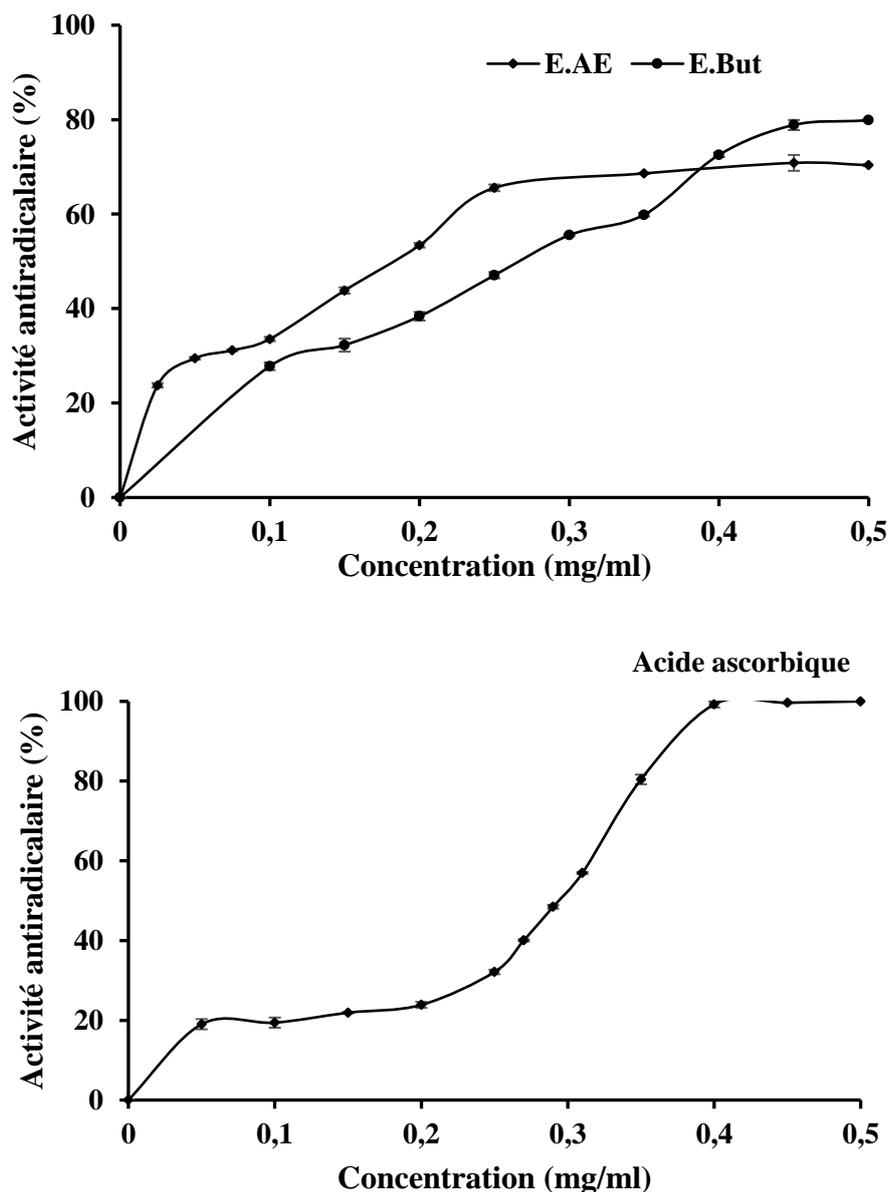


Figure 26. Effet piègeur du radical hydroxyle par l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas* et de l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

Ce pouvoir antiradicalaire des deux extraits étudiés est particulièrement dû à la présence des polyphénols, composés connus par leur capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène. En effet, Il a été prouvé que l'acide caféique, l'acide férulique et l'acide chlorogénique, des acides phénoliques présents en grandes quantités dans notre plante ont une bonne activité antiradicalaire vis-à-vis du radical hydroxyle (Arrua *et al.*, 2010). Les travaux de Si *et al.* (2011) ont montré que la quercétine, l'apigénine et la lutéoline sont les flavonoïdes responsables de l'effet piègeur du radical hydroxyle.

Pereira *et al.* (2017) ont rapporté que la décoction et l'infusion de *H. italicum* possèdent une forte capacité de piéger le radical hydroxyle.

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est une forme réduite d'oxygène moléculaire qui joue un rôle important dans la formation d'autres ROS telles que le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et l'oxygène singulet (Snezhkina *et al.*, 2019). Une augmentation de la production cellulaire en $O_2^{\cdot-}$ est fortement corrélée avec l'apparition de maladies cardiovasculaires ainsi qu'avec des pathologies neurodégénératives (Kumar *et al.*, 2014). Le pouvoir piégeur de l' $O_2^{\cdot-}$ par les extraits d'*H. stoechas* a été évalué en suivant la diminution de la réduction de NBT par le superoxyde produit chimiquement dans le système NADH-PMS.

L'activité de piégeage de l'anion superoxyde des extraits de *H. stoechas* est concentration dépendante (**figure 27**). l'E.AE et l'E.But ont présenté des capacités de piégeage différentes avec des IC_{50} de $54.82 \pm 1.50 \mu\text{g/ml}$ et de $83.67 \pm 1.02 \mu\text{g/ml}$ respectivement. Les deux extraits possèdent un pouvoir piégeur du radical superoxyde plus faible que l'acide gallique utilisé comme antioxydant de référence ($IC_{50} = 44.02 \pm 0.84 \mu\text{g/ml}$).

La capacité antioxydante en piégeant le radical superoxyde semble être lié à la présence des flavonoïdes dans ces extraits. Les flavonoïdes sont d'importants constituants de plantes, ayant la capacité de piéger les espèces radicalaires (Cheurfa et Allem, 2016). En effet, Fazilatun *et al.* (2004) ont rapporté que la quercétine et la lutéoline, deux flavonoïdes présents dans les extraits étudiés, ont une activité potentielle vis-à-vis du radical superoxyde. En outre, les travaux de Les *et al.* (2017) ont montré que l'extrait méthanolique de *H. stoechas* possède un bon effet piégeur de l'anion superoxyde.

Le peroxyde d'hydrogène est un faible agent oxydant qui peut inactiver directement quelques enzymes, généralement par oxydation des groupes thiols essentiels (-SH). Il peut aussi traverser rapidement les membranes cellulaires. Une fois à l'intérieur de la cellule, l' H_2O_2 peut probablement réagir avec les ions Fe^{2+} et Cu^{2+} pour former le radical hydroxyle. Pour cela, il est important de réduire le taux de cette molécule dans la cellule (Saha et Verma, 2015).

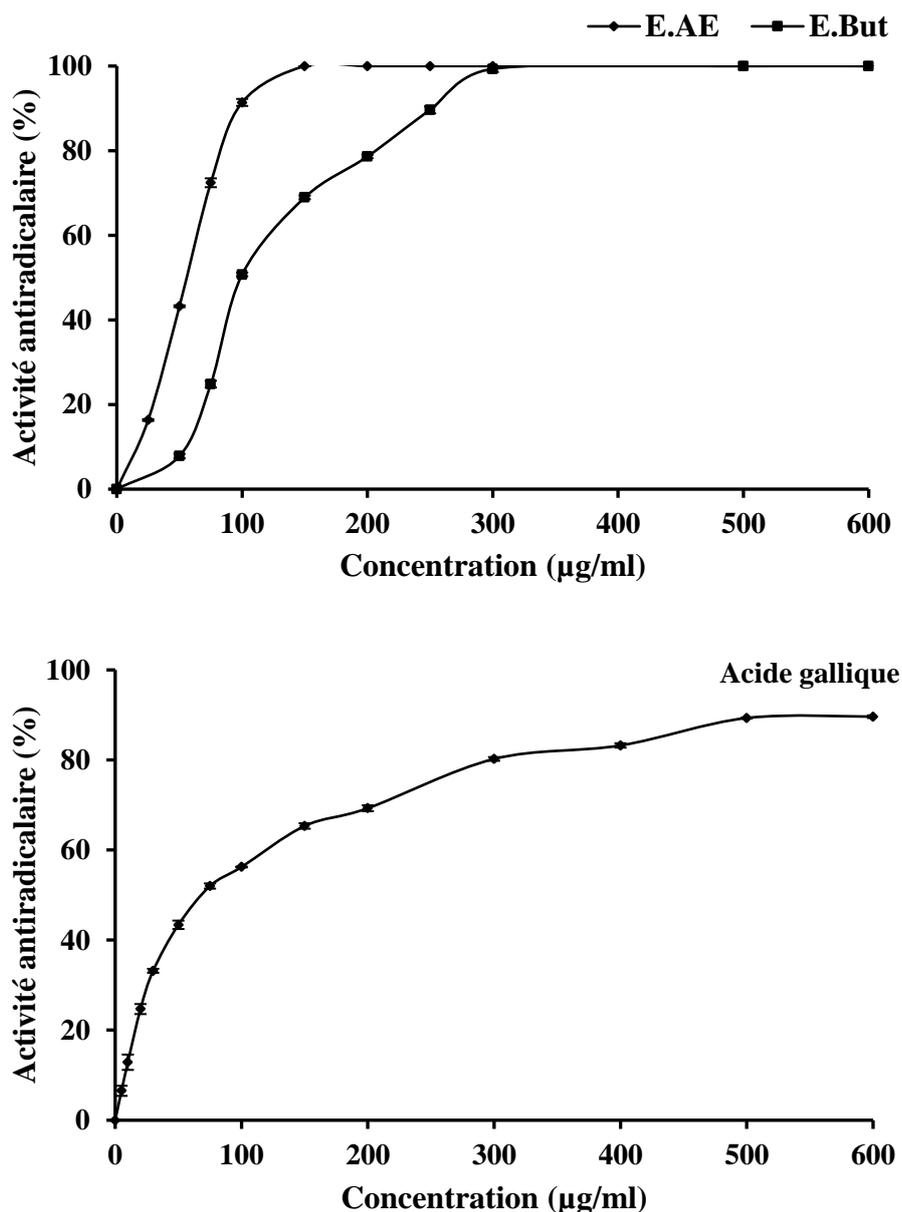


Figure 27. Effet piègeur de l'anion superoxyde par l'extrait d'acétate d'éthyle (**E.AE**) et butanolique (**E.But**) de *H. stoechas* et de l'acide gallique. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

Les résultats obtenus montrent que nos extraits piègent le peroxyde d'hydrogène d'une manière concentration dépendante (**figure 28**). A 10 µg/ml, l'E.AE et l'E.But présentent le même effet piègeur (94.27 % et 94,89 %). En effet, l'E.AE et l'E.But ont montré une capacité de piégeage importante avec des IC_{50} très faibles de l'ordre de 1.34 ± 0.12 µg/ml et de 2.00 ± 0.17 µg/ml, respectivement. Ces résultats sont nettement supérieurs à celui de l'acide ascorbique ($IC_{50} = 80.43 \pm 1.82$ µg/ml).

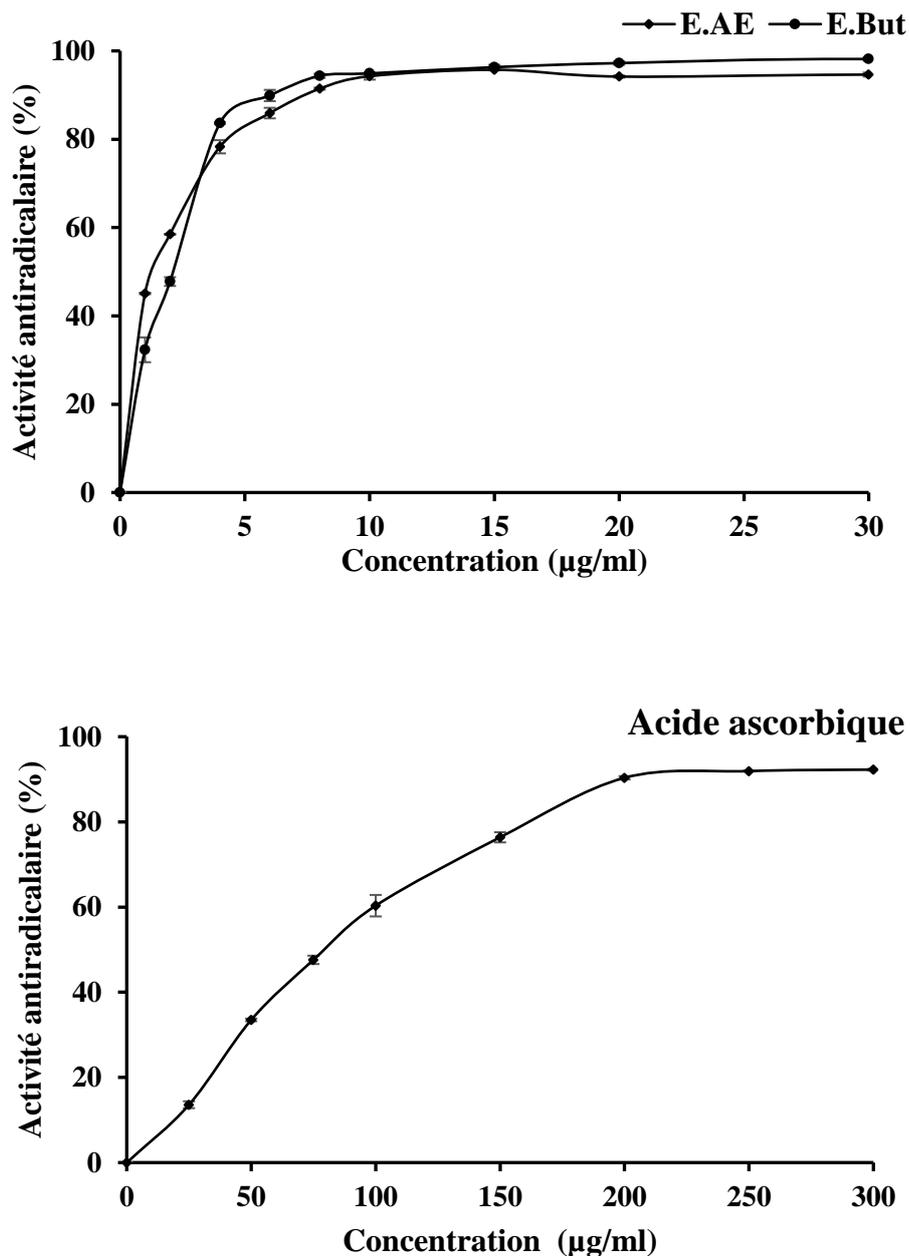


Figure 28. Effet piègeur du peroxyde d'hydrogène par l'extrait d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas* et de l'acide ascorbique. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

Le piégeage du peroxyde d'hydrogène par les extraits de *H. stoechas* peut être attribué à leurs composés phénoliques, qui donnent leur électron à l' H_2O_2 , le réduisant ainsi en eau. En effet, Il a été rapporté que l'acide caféique, l'acide gallique et la quercétine protègent les cellules de mammifères contre la cytotoxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (Saffoon *et al.*, 2014). Taşkın *et al.* (2020) ont trouvé que l'extrait méthanolique de *Helichrysum plicatum* riche en polyphénols possède une grande capacité à neutraliser le peroxyde d'hydrogène.

IV.2.2. Effet sur la peroxydation des lipides

Dans le test de blanchissement du β -carotène, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres due à l'abstraction d'un atome d'hydrogène à partir des groupes méthylène de l'acide linoléique. Puis le radical libre va oxyder le β -carotène hautement insaturé. La présence des antioxydants dans l'extrait permet de minimiser l'oxydation du β -carotène par les hydro-péroxydes qui sont neutralisés. L'aptitude des extraits de *H. stoechas* à ralentir la vitesse de l'oxydation du β -carotène a été évaluée par mesure de la variation de l'absorbance avec le temps.

La cinétique de blanchiment du β -carotène en présence et en absence des extraits de *H. stoechas* et de BHT montre que les deux extraits ainsi que le BHT inhibent de manière significative l'oxydation couplée de l'acide linoléique/ β -carotène par rapport au contrôle négatif (**figure 29**). Le changement de l'absorbance à différents intervalles de temps montre que l'E.AE et l'E.But exercent des effets inhibiteurs d'environ 82%. Ces inhibitions sont meilleures que celle obtenue avec le BHT (65%).

L'activité des extraits est peut-être due à leurs capacités d'inhiber la peroxydation lipidique et/ou de piéger les radicaux de l'acide linoléique (Krimat *et al.*, 2017). Un extrait qui retarde ou inhibe le blanchissement du β -carotène peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire (Parakash *et al.*, 2007). Les polyphénols d'une manière générale ont la capacité de piéger les radicaux libres et par conséquent, retarder l'auto-oxydation des lipides (Ayala *et al.*, 2014). Il a été démontré aussi, que la structure et la propriété lipophile des polyphénols sont des facteurs favorisant la propriété antioxydante, probablement en facilitant l'incorporation de ces composés dans la phase lipidique de la membrane (Amessis-Ouchemoukh *et al.*, 2014).

Afin de confirmer la capacité des extraits à diminuer la peroxydation lipidique causée par les radicaux libres, le test de thiocyanate ferrique a été utilisé. Durant l'oxydation de l'acide linoléique il y a formation de peroxyde dans l'émulsion où le fer ferreux (Fe^{2+}) est oxydé en fer ferrique (Fe^{3+}). Ce dernier forme un complexe avec le thiocyanate d'ammonium (SNC^-) pour donner le thiocyanate ferrique $\text{Fe}(\text{SNC})^{2+}$, de couleur rouge brique qui possède une absorbance maximale à 500 nm (Gülçin *et al.*, 2007).

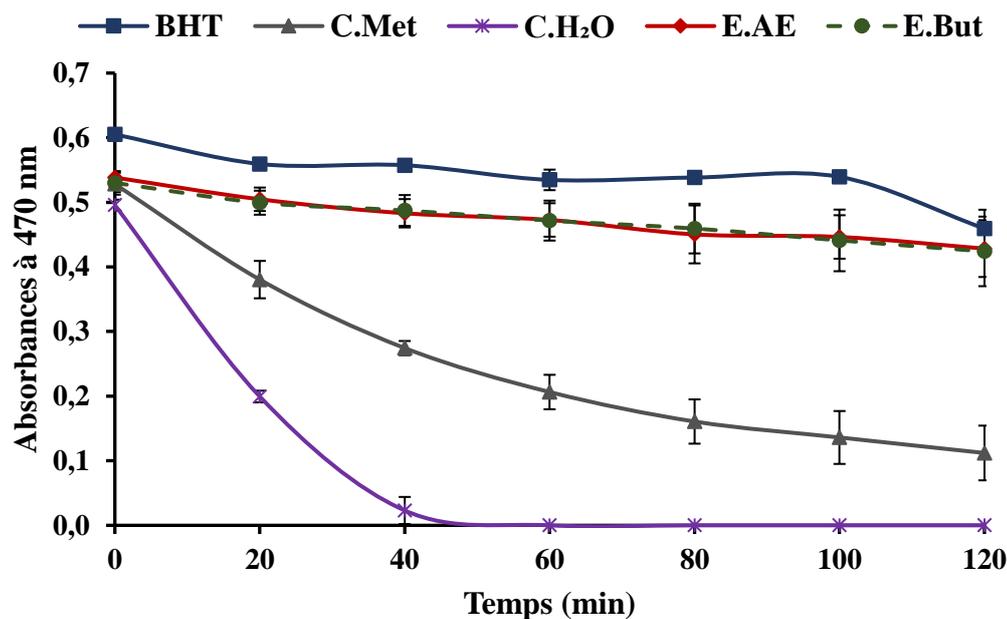


Figure 29. Cinétique de blanchissement du β -carotène en présence et en absence des extraits d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas* et du BHT. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

La **figure 30** montre la cinétique de peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits de *H. stoechas* et du BHT. Les absorbances observées sont stables tout au long des 96 heures d'incubation, indiquant une forte activité antioxydante par rapport au contrôle négatif. A une concentration de 50 μ g/ml, les extraits d'acétate d'éthyle et butanolique exercent des effets inhibiteurs de la peroxydation de 87.08 % et 85.80 % respectivement. Ces valeurs sont statistiquement inférieures à celle du BHT qui exerce un effet inhibiteur de 89.09 % à la même concentration.

Durant la peroxydation lipidique, les antioxydants agissent de différentes façons à savoir le balayage des radicaux libres, la décomposition des peroxydes et la chélation des ions métalliques. Souvent, plus d'un mécanisme sont impliqués synergiquement pour avoir un bon effet (Moure *et al.*, 2001).

Sandhar *et al.* (2011) ont rapporté que les flavonoïdes peuvent inhiber la peroxydation lipidique en un stade précoce par l'activité scavenger des radicaux peroxydes comme ils peuvent interrompre une chaîne de réactions radicalaires par la propriété de donation d'hydrogène. En effet, Sharififar *et al.* (2009) ont prouvé que la rutine et l'apigénine sont impliqués dans l'inhibition de la peroxydation lipidique. De plus, Burda et Oleszek (2001), ont rapporté que les flavonoïdes aglycones donnent une activité meilleure que celle des

flavonoïdes glycosylés à cause du blocage des fonctions hydroxyles en C3, ce qui pourrait expliquer la différence des taux d'inhibition entre l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique. En outre, Barroso *et al.* (2014), ont montré que les extraits aqueux et méthanolique de *H. stoechas* exercent un bon effet inhibiteur de la peroxydation lipidique.

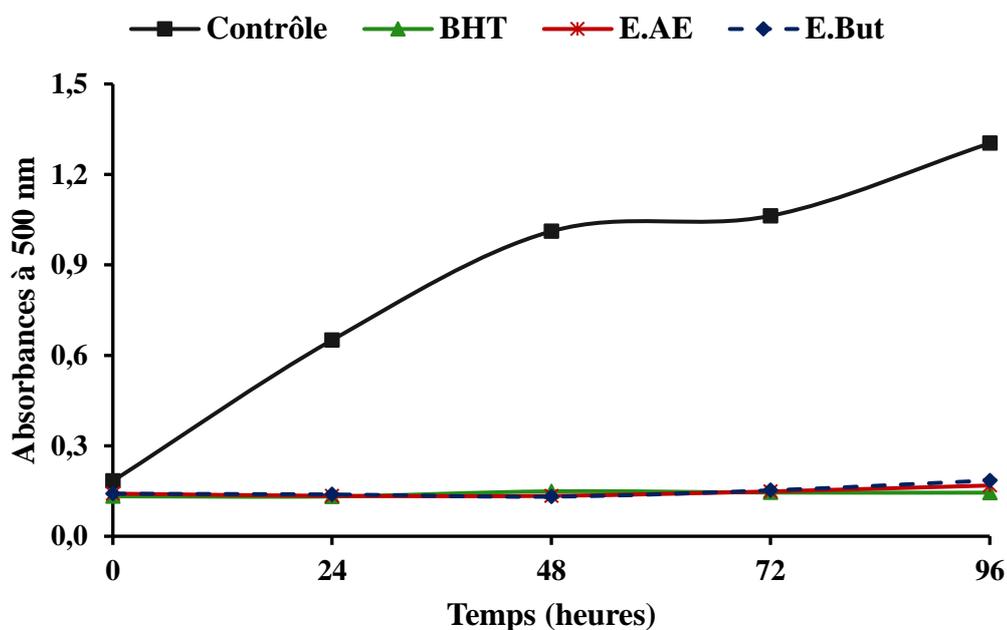


Figure 30. Cinétique de la peroxydation de l'acide linoléique en présence et en absence des extraits d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas* et du BHT. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

IV.2.3. Activité réductrice

Dans cette méthode rapide, reproductible et facile, l'activité antioxydante est déterminée par la mesure de la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en ion ferreux (Fe^{2+}).

La **figure 31**, montre que les deux extraits possèdent un pouvoir réducteur remarquable et concentration-dépendant. En effet, l'E.AE et l'E.But présentent des capacités réductrice similaires avec des EC_{50} respectives de $20.77 \pm 0.98 \mu\text{g/ml}$ et de $20.57 \pm 0.83 \mu\text{g/ml}$. Ces résultats sont similaires à celui du BHT ($\text{EC}_{50} = 21.06 \pm 1.04 \mu\text{g/ml}$).

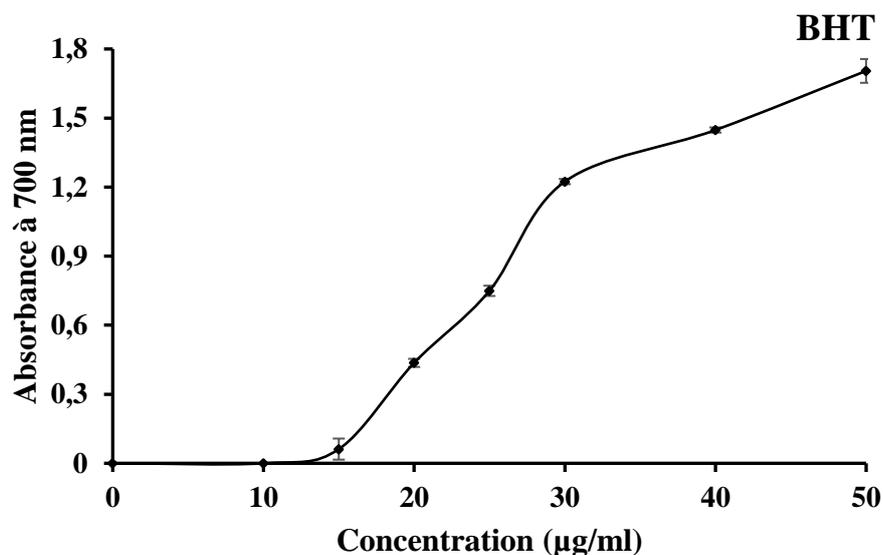
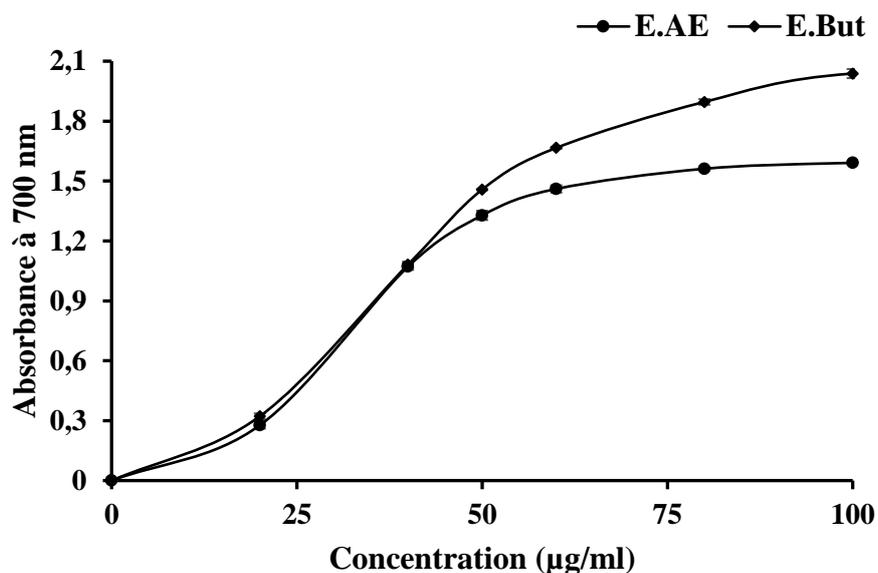


Figure 31. Pouvoir réducteur des extraits d'acétate d'éthyle (**E.AE**) et butanolique (**E.But**) de *H. stoechas* et du BHT. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

Ce pouvoir réducteur est probablement dû à la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électrons. En effet, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs d'oxydants (Bammou *et al.*, 2020). Zengin *et al.*, (2020) ont trouvé qu'il y'a une forte corrélation entre le contenu en polyphénols et en flavonoïdes des extraits méthanoliques de *H. stoechas* subsp. *barrelieri*

obtenus par différentes techniques d'extraction et leur activité réductrice. De plus, Ibrahim *et al.* (2017) ont montré que l'extrait méthanolique de *H. stoechas* exerce un pouvoir réducteur très important. Ces auteurs réfèrent l'activité antioxydante des extraits de cette plante à la présence d'acides phénoliques et de flavonoïdes ce qui supporte les résultats de la présente étude.

La capacité antioxydante totale a été mesurée en utilisant la méthode de phosphomolybdate qui se base sur la réduction du molybdate (Mo^{6+}) en molybdène (Mo^{5+}) en présence des antioxydants et la formation d'un complexe phosphate/ Mo^{5+} d'une couleur verte mesurable à 695 nm.

Les résultats de ce test (**tableau 6**) montrent clairement que l'extrait d'acétate d'éthyle possède une capacité antioxydante plus importante que celle de l'extrait butanolique.

Tableau 6. Capacité antioxydante totale des extraits d'acétate d'éthyle (**E.AE**) et butanolique (**E.But**) de *H. stoechas*.

Extraits	E.AE	E.But
TAC		
($\mu\text{g EVC} / \text{mg d'extrait}$)	415.38 ± 41.12	338.39 ± 36.03

Les valeurs représentent la moyenne de 3 essais \pm SD.

Cette bonne capacité antioxydante est attribuée à la présence de composés phénoliques notamment les flavonoïdes qui sont connus pour leur capacité à piéger les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (Sharififar *et al.*, 2009). Une corrélation entre le contenu en polyphénols et en flavonoïdes et la capacité antioxydante totale a été rapportée par Silva *et al.* (2013). En effet, les résultats de l'étude effectuée sur les extraits de *Vernonia condensata Baker* (Asteraceae), montrent que la capacité antioxydante de l'extrait d'acétate d'éthyle est supérieure à celle de l'extrait butanolique. De plus, Haddouchi *et al.* (2014) ont montré que l'extrait méthanolique des fleurs de *H. stoechas* subsp. *rupestre* possèdent une capacité antioxydante totale meilleure que celle obtenue par l'extrait méthanolique des tiges feuillées.

IV.2.4. Activité anti-hémolytique

La membrane de l'érythrocyte est riche en acides gras polyinsaturés, qui en présence d'un radical libre tel que l'AAPH subit une série d'oxydation des molécules de la bicouche lipidique, conduisant à l'hémolyse des érythrocytes (Yang *et al.*, 2017).

À partir des cinétiques d'hémolyses des érythrocytes obtenues (**figure 32**), il ressort que le prétraitement par les extraits de *H. stoechas* fait augmenter le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse induite par l'AAPH par rapport au contrôle négatif. Il apparait aussi qu'il y a un effet concentration dépendant de ces extraits sur l'accroissement de la résistance de la membrane cellulaire des érythrocytes vis-à-vis de l'attaque radicalaire. A une concentration de 40 µg/ml, l'E.AE et l'E.But entraînent une diminution significative de l'hémolyse érythrocytes avec des temps de demi-hémolyse (HT₅₀) respectives de 185.58 ± 7.45 min et de 138.50 ± 1.57 min. Ces résultats sont meilleurs que celui du Trolox (HT₅₀ = 115.47 ± 0.41 min) utilisé comme standard (**tableau 7**).

Tableau 7. Effet des extraits d'acétate éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas* et du Trolox sur la lyse érythrocytaire induite par l'AAPH.

Concentration (µg/mL)	Temps de demi-hémolyse (min)			
	05	10	20	40
Contrôle	52.30 ± 0.31			
E.AE	89.05 ± 5.45**	113.64 ± 3.50***	145.68 ± 6.73***	185.58 ± 7.45***
E.But	64.43 ± 4.53***	73.70 ± 4.32***	96.15 ± 3.53***	138.50 ± 1.57***
Trolox	77.29 ± 1.25***	86.35 ± 3.31***	93.70 ± 3.47***	115.47 ± 0.41***

Les valeurs représentent la moyenne ± SD (n=3). ***: $p < 0.001$; **: $p < 0,01$ vs contrôle.

L'effet anti-hémolytique des extraits d'*H. stoechas* peut être justifié par le fait que ces extraits sont riches en polyphénols et plus particulièrement en flavonoïdes. En effet, l'étude réalisée par Asgary *et al.* (2005) a montré que la rutine et la quercétine préviennent les globules rouges humains contre l'hémolyse induite par l'AAPH. De même, Velloso *et al.* (2011) confirment que la quercétine et l'isoquercétine ont présenté une capacité anti-hémolytique très intéressante.

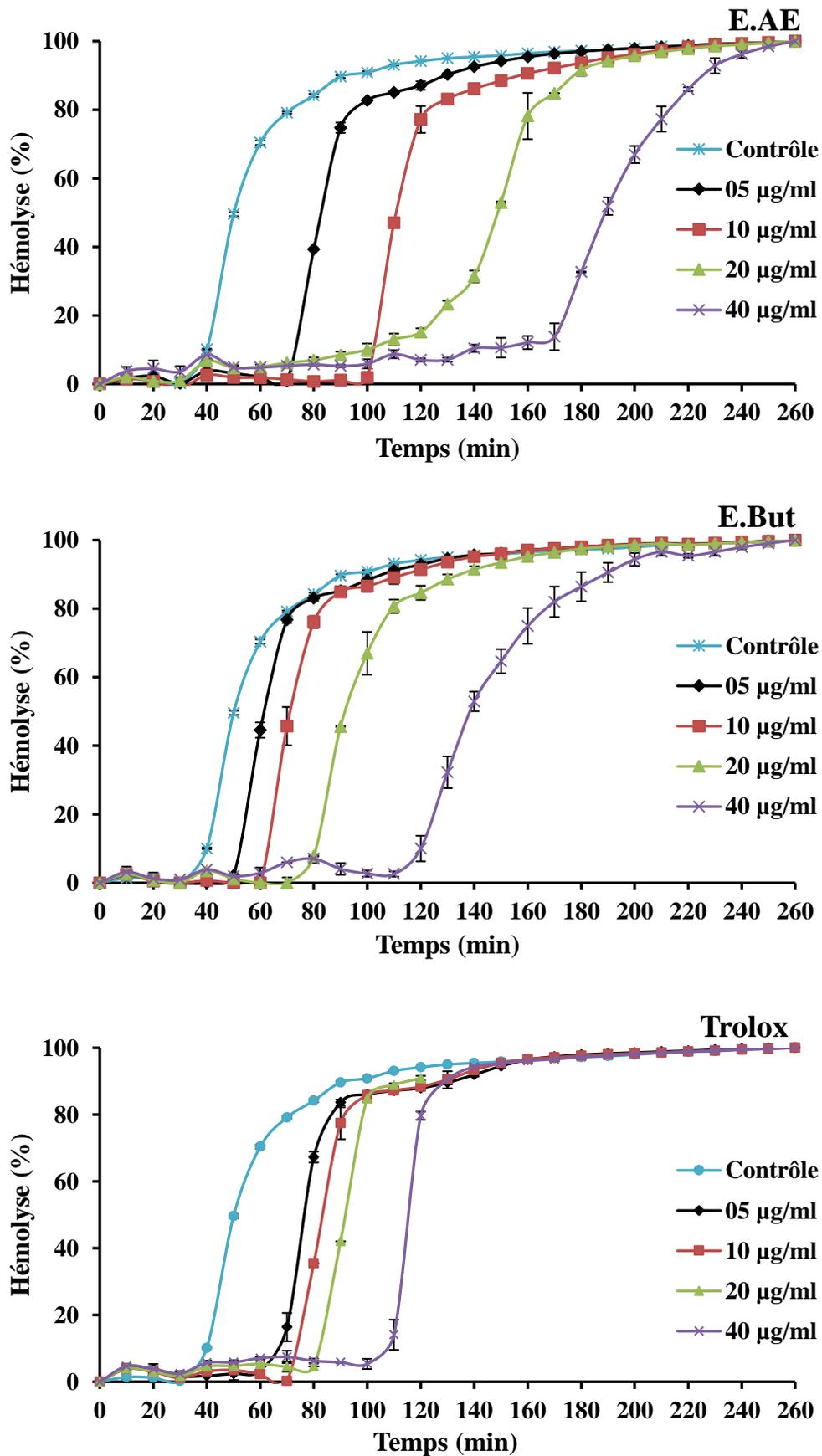


Figure 32. Activité anti-hémolytique des extraits d'acétate d'éthyle (E.AE) et butanolique (E.But) de *H. stoechas* et du Trolox. Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais \pm SD.

**CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude phytochimique des extraits obtenus a montré que l'extrait d'acétate éthylique est plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait butanolique. L'analyse par LC-ESI-MS a permis d'identifier l'acide férulique, l'isoquercétine, l'acide chlorogénique, l'acide ellagique, la quercétine, la quercétine 3-*O*-galactoside, la rutine, l'epicatéchine et le catéchol comme composés majoritaires dans les deux extraits.

L'étude de la toxicité aigüe de cette plante a permis de conclure que les extraits d'acétate éthylique et butanolique ne sont pas toxiques.

Les deux extraits exercent un effet antiœdémateux important par application locale et inhibent aussi le recrutement des cellules immunitaires vers le site inflammatoire. Ils ont la capacité d'inhiber la cytokine pro-inflammatoire IL-17A et à induire l'anti-inflammatoire IL-10. Ces extraits protègent la membrane des hématies contre l'hémolyse ainsi que la dénaturation de l'albumine.

D'autre part, les extraits étudiés ont montré un effet antioxydant important avec une amélioration des taux des marqueurs du stress oxydant (GSH, CAT, SOD et MDA) au niveau du tissu hépatique. En plus, ces deux extraits présentent des activités antioxydantes intéressantes dans les différents systèmes utilisés : piégeage des radicaux (DPPH[•], ABTS^{•+}, OH[•], O₂^{•-}, H₂O₂), blanchiment de la β-carotène, peroxydation de l'acide linoléique, pouvoir réducteur, TAC et l'hémolyse induite par l'AAPH.

La majorité des activités biologiques des plantes médicinales sont attribuées à leurs métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques. Et puisque notre plante étant est riche en divers composés phénoliques comme l'a montré l'analyse phytochimique, les activités des extraits se trouvent justifiées.

Les résultats obtenus permettent de suggérer l'utilisation des extraits de *Helichrysum stoechas* dans différents domaines, agroalimentaire, cosmétique, et pharmaco-médical pour remplacer les antioxydants et les anti-inflammatoires de synthèse. D'autres études complémentaires doivent se faire pour isoler, purifier et identifier les molécules responsables des activités biologiques démontrées.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aebi H, (1984), Catalase *in vitro*. *Method Enzymol*, 105: 121–126.
- Aiassa V, Zoppi A, Albesa I, Longhi MR, (2015). Inclusion complexes of chloramphenicol with β -cyclodextrin and aminoacids as a way to increase drug solubility and modulate ROS production. *Carbohydr. Polym.*121, 320–327.
- Aires A, Carvalho R, (2017). Screening of polyphenol composition and antiradical capacity of wild *Erica arborea*: a native plant species from the Portuguese flora. *J Chromatogr Sep Tech*, 8: 379.
- 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.
- Albayrak S, Aksoy A, Sagdic O, Hamzaoglu E, (2010). Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Turkey. *Food Chem*, 119: 114–122.
- Amessis-Ouchemoukh N, Abou-reidah IM, Quirantes-Piné R, Rodriguez-Pérez C, Madani K, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A, (2014). Tentative characterisation of iridoids, phenylithanoid glucosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves by LC-ESI-QTOF-MS. *Phytochem Anal*, 25(5): 389–398.
- Amiot MJ, Riollet C, Landrier JF, (2009). Polyphénols et syndrome métabolique: Polyphenols and metabolic syndrome. *Med. des Mal. Metab*, 3(5), 476-482.
- Amro BI, Haddadin RN, Tawaha K, Mohammad M, Mashallah SM, Assaf A, (2013). *In vitro* antimicrobial and anti-inflammatory activity of Jordanian plant extracts: a potential target therapy for Acne vulgaris. *Afr J Pharm Pharmacol*, 7: 2087–2099.
- Ani V, Varadaraj MC, Naidu KA, (2006). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.). *Eur Food Res Technol*, 224(1): 109–115.
- Anosike CA, Obidoa O, Ezeanyika LU, (2012). Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *Daru*, 20: 76.
- Apaydin Yildirim B, Kordali S, Terim Kapakin KA, Yildirim F, Aktas Senocak E, Altun S, (2017). Effect of *Helichrysum plicatum* DC. subsp. *plicatum* ethanol extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Zhejiang Univ Sci B*, 18(6): 501–511.
- Arrua D, Strumia MC, Nazareno MA, (2010). Immobilisation of caffeic acid on a polypropylene film: synthesis and antioxidant properties. *J Agric Food Chem*, 58(16): 9228–9234.
- Asgary S, Naderi G, Askari N, (2005). Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp Clin Cardiol*, 10(2): 88–90.

- Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ, (2012). Inflammation: Mechanisms, costs, and natural variation. *Annu Rev Ecol Evol Syst*, 43: 385–406.
- Ayala A, Munoz M.F, Arguelles S, (2014). Lipid peroxidation : Production, Metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014: 1–41.
- Aymeric J-L, Lefranc G, (2009). Immunologie humaine. De Boeck Supérieur, p. 59.
- Bae JS. (2012). Role of high mobility group box 1 in inflammatory disease: focus on sepsis. *Arch Pharm Res*, 35(9): 1511–1523.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunete C, Dine T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luycky M, Gazin M, (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel Forschung*, 46(11): 1086–1089.
- Bammou M, Bouhlali EDT, Sellam K, El-Rhaffari L, Ibijbijen J, Nassiri L, (2020). Évaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton. *Phytothérapie*, DOI: 10.3166/phyto-2020-0226.
- Barnes JB, Adcock IM, (2009). Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*, 373(9678): 1905–1917.
- Barrera G, (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol*, 2012: 1–21.
- Barros L, Heleno SA, Carvalho AM, Ferreira ICFR, (2010). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT- Food Science and Technology*, 43(3): 544–550.
- Barroso MR, Barros L, Dueñas M, Carvalho AM, Santos-Buelga C, Fernandes IP, Barreiro MF, Ferreira ICFR, (2014). Exploring the antioxidant potential of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench phenolic compounds for cosmetic applications: Chemical characterisation, microencapsulation and incorporation into a moisturiser. *Ind Crops Prod*, 53: 330–336.
- Baudin B, (2020). Stress oxydant et protections antioxydantes, *Rev Francoph Lab*, 2020(522): 22–30.
- Becker G, Monassier L, (2018). Anti-inflammatoires non stéroïdiens : rappels pharmacologiques et évolutions récentes de l'état des connaissances. *Med Ther*, 24(4): 240–248.
- Belaïch R, Boujraf S, (2016). Facteurs inflammatoires et stress oxydant chez les hémodialysés: effets et stratégies thérapeutiques. *Med Mal Metab*, 10(1): 38–42.
- Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. (2015). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*, 65(23): 1865–1874.

- Biasutto L, Mattarei A, Zoratti M, (2012). Resveratrol and health: the starting point. *Chembiochem*, 13(9): 1256–1259.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5, 9-19.
- Biswas SK, (2016). Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox?. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 5698931.
- Bonnefont-Rousselot D, Borderie D, Beaudoux JL, Charpiot P, (2019). Exploration en biochimie médicale : interprétations et orientations diagnostiques. Chapitre 10 : Exploration biochimique du déséquilibre redox. Médecine- Sciences, Lavoisier.
- Borgonetti V, Les F, López V, Galeotti N, (2020). Attenuation of anxiety-like behavior by *Helichrysum stoechas* (L.) Moench methanolic extract through up-regulation of erk signaling pathways in noradrenergic neurons. *Pharmaceuticals*, 13(12), 472.
- Boubakeur H, Rebbas K, Belhattab R, (2017). Activités antioxydante et antibactérienne des extraits d'*Helichrysum stoechas* (L.) Moench. *Phytothérapie*, DOI: 10.1007/s10298-017-1104-5.
- Bouhlali ET, Bammou M, Sellam K, Benlyas M, Alem C, Filali-Zegzouti Y, (2016). Evaluation of antioxidant, antihemolytic and antibacterial potential of six Moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) varieties. *J King Saud Univ Sci*, 28(2): 136–142.
- Boulanger E, Dequiedt P, Wautier JL, (2002). Advanced glycosylation end products (AGE): new toxins?. *Nephrologie*, 23(7): 351–359.
- Brandstatter H, Samer CF, Ribl C, Piguet V, (2010). Réactions d'hypersensibilité immédiates aux anti-inflammatoires non stéroïdiens : allergie ou pseudo-allergie ?, *Rev Med Suisse*, 6(255): 1345–1350.
- Brunet S, Hoste H, (2006). Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J Agric Food Chem*, 54: 7481–7487.
- Buckley CD, Gilroy DW, Serhan C N, (2014). Proresolving Lipid Mediators and Mechanisms in the Resolution of Acute Inflammation. *Immunity*. 40(3): 315–327.
- Burda S, Oleszek W, (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem*, 49(6): 2774–2779.
- Cabrini DA, Moresco HH, Imazu P, et al (2011). Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of *Averrhoa carambola* L. in mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011: 908059.
- Capiralla H, Vingtdoux V, Zhao H, Sankowski R, Al-Abed Y, Davies P, Marambaud P, (2012). Resveratrol mitigates lipopolysaccharide- and A β -mediated microglial inflammation by inhibiting the TLR4/NF- κ B/STAT signaling cascade. *J Neurochem*, 120(3): 461–472.

- Carocho M, Ferreira IC, (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, 51, 15-25.
- Castellani P, Balza E, Rubartelli A, (2014). Inflammation, DAMPs, tumor development, and progression: a vicious circle orchestrated by redox signaling. *Antioxid Redox Signal*, 20(7), 1086–1097.
- Chandan BK, Saxena AK, Shukla S, Sharma N, Gupta DK, Suri KA, Suri J, Bhadauria M, Singh B, (2007). Hepatoprotective potential of *Aloe barbadensis* Mill. against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *J Ethnopharmacol*, 111(3): 560–566.
- Chaouche TM, Haddouchi F, Zerhouni K, Sidi-yekhelef A, (2016). Evaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas subsp rupestre*. *Revue internationale des sciences et technologie*, 12(3): 144–150.
- Charles NS, Peter AW, Derek WG, (2010). Fundamentals of inflammation. Cambridge University Press, 2–3.
- Chatterjee S, (2016). Chapter Two - Oxidative Stress, Inflammation, and Disease, in: Dziubla, T., Butterfield, D.A.B.T.O.S. and B. (Eds.). Academic Press, pp. 35–58.
- Chen GL, Fan MX, Wu JL, Li N, Guo MQ, (2019). Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule. *Food Chem*, 277: 706–712.
- Cheurfa M, Allem R, (2016). Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie *in vitro*. *Phytothérapie*, 14: 181–187.
- Chibli LA, Rodrigues KCM, Gasparetto CM, Pinto NCC, Fabri RL, Scio E, Alves MS, Del-Vechio-Vieira G, Sousa OV, (2014). Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *J Ethnopharmacol*, 154: 330–338.
- Colville-Nash P, Lawrence T, (2003). Air-Pouch Models of Inflammation and Modifications for the Study of Granuloma-Mediated Cartilage Degradation. In: Winyard PG, Willoughby DA, editors. *Inflammation Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; p. 181-189.
- Deaton CM, Marlin DJ, (2011). Exercice-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 2(3): 278–291.
- Deattu N, Narayanan N, Suseela L, (2012). Evaluation of Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of Polyherbal Extract by *In Vitro* Methods. *Res J Pharm Biol Chemical Sci*, 3(4): 727–732.
- Debnath PC, Das A, Islam A, Islam MA, Hassan MM, Gias Uddin SM, (2013). Membrane stabilisation – A possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of a Bangladeshi medicinal plant: *Erioglossum rubiginosum* (Bara Harina). *Pharmacogn J*, 5(3): 104–107.

- Delves PJ, Burton DR, Martin SJ, Roitt IM, (2008). Les fondements de l'immunologie. Paris : De Boeck, p. 256–284.
- Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM, Stocker P, (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem Toxicol*, 48: 2599–2606.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Butassouna D, Stocker P, Vidal N, (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem*, 97(4): 654–660.
- Duarte DB, Vasko MR, Fehrenbacher JC, (2012). Models of inflammation: carrageenan air pouch. *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 5, Unit5.6-Unit5.6.
- Edwards C, (2012). Sixty years after Hench: corticosteroids and chronic inflammatory disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(5):1443–51.
- Ellman GL, (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82(1): 70–77.
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM, (2007). Inflammation in wound repair: Molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*, 127(3): 514–525.
- Fabre G, Bayach I, Berka K, Starok M, Rossi C, Duroux J-L, Otyepka M, Trouillas P, (2015). Synergism of antioxidant action of vitamins E, C and quercetin is related to formation of molecular associations in biomembranes. *Chem Commun*. 51(36): 7713–7716.
- Falleh H, Oueslati S, Guyot S, Dali AB, Magné C, Abdelly C, Ksouri R. (2011). LC/ESI-MS/MS characterisation of procyanidins and propelargonidins responsible for the strong antioxidant activity of the edible halophyte *Mesembryanthemum edule* L. *Food Chem*, 127(4): 1732–1738.
- Favier A, (2006). Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann Pharm Fr*, 64(6): 390-396.
- Fazilatun N, Nornisah M, Zhari I, (2004). Superoxide radical scavenging properties of extracts and flavonoids isolated from the leaves of *Blumea balsamifera*. *Pharm Biol*, 42(6): 404–408.
- Felipe SA, Rodrigues ES, Martin RP, Paiva AC, Pesquero JB, Shimuta SI, (2007). Functional expression of kinin B1 and B2 receptors in mouse abdominal aorta. *Braz J Med Biol Res*, 40(5): 649–655.
- Fialkow L, Wang Y, Downey GP, (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*, 42(2), 153–164.
- Fu R, Chen F, Guo Y, (2020). Anti-inflammatory mechanism and active ingredients of the Chinese tallow tree. *J Ethnopharmacol*, 250: 112497.
- Gambini J, Granier R, (2013). Effets indésirables des rayons X. EMC - radiologie et imagerie médicale : Principes et techniques – *Radioprotection* : 1–20.

- Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z, Jore D, (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité chimique*, 91–96.
- Gilbert T, Draï J, Bonnefoy M, (2013). Stress oxydant et maladie d'Alzheimer. In *Traité sur la maladie d'Alzheimer* (pp. 175-194). Springer, Paris.
- Gillery P, (2006). Oxidative stress and protein glycation in diabetes mellitus. *Ann Biol Clin (Paris)*, 64(4): 309–314.
- Gouveia-Figueira SC, Gouveia CA, Carvalho MJ, Rodrigues AI, Nording ML, Castilho PC, (2014). Antioxidant capacity, cytotoxicity and antimycobacterial activity of *Madeira Archipelago* Endemic *Helichrysum* dietary and medicinal plants. *Antioxidants (Basel)*, 31, 3(4): 713–29.
- Gulcin I, Alici HA, Cesur M, (2005). Determination of *in vitro* antioxidant and radical scavenging activities of propofol. *Chem Pharm Bull*, 53(3): 281–285.
- Gülçin Ý, Elias R, Gepdiremen A, Boyer A, Köksal E, (2007). A comparative study on the antioxidant activity of fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.) extracts. *Afr J Biotechnol*, 6(4): 410–418.
- Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini IK, Aggarwal BB, (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat prod rep*, 28(12): 1937–1955.
- Haddouchi F, Chaouche TM, Ksouri R, Medini F, Sekkal FZ, Benmansour A, (2014). Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. rupestre and *Phagnalon saxatile* subsp. saxatile. *Chin J Nat Med*, 12(6): 415–422.
- Haddouchi F, Zerhouni K, Sidi-Yekhelef A, Chaouche TM, (2016). Évaluation de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'*Helichrysum stoechas* subsp. rupestre. *Bull. Soc. R. Sci. Liege*, 85, 152-159.
- Hardbower DM, de Sablet T, Chaturvedi R, Wilson KT, (2013). Chronic inflammation and oxidative stress: the smoking gun for *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer?. *Gut microbes*, 4(6), 475–481.
- Headland SE, Norling LV, (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology*, p. 1–12.
- Hmidani A, Bouhlali EDT, Khouya T, Ramchoun M, Filali-Zegzouti Y, Alem C, Benlyas M, (2019). Antioxidant, anti-inflammatory and anticoagulant activities of three *Thymus* species grown in southeastern Morocco. *Futur J Pharm Sci*, 5: 4.
- Hokayem M, Bisbal C, Lambert K, Avignon A, (2012). Quelle place pour les antioxydants dans la prévention du diabète de type 2?. *Med. Mal. Metab*, 6(4), 327-331.
- Hurd TR, DeGennaro M, Lehmann R, (2012). Redox regulation of cell migration and adhesion. *Trends Cell Biol*, 22(2): 107–115.

- Hussain MS, Azam F, Eldarrat HA, Alkskas I, Mayoof JA, Dammona JM, Haque, A, (2020). Anti-inflammatory, analgesic and molecular docking studies of Lanostanoic acid 3-O- α -D-glycopyranoside isolated from *Helichrysum stoechas*. *Arab. J. Chem*, 13(12), 9196-9206.
- Ibrahim FA, Bellail AA, Hamad AM, (2017). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of some native plants in El-Jabal El-Akhdar Province – Libya. *Ijsrm. Human*, 5(4): 79–94.
- Iwalewa EO, McGaw LJ, Naidoo V, Eloff GN, (2007). Inflammation: The foundation 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.
- Jones WP, Kinghorn AD, (2005). Extraction of plant secondary metabolites. In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI, *Natural products isolation*. 2 éd. Totowa, Humana Press, 411p.
- Júlio de Souza AL, Beatriz Mahler Pereira A, Robison de Oliveira J, Santos Ramalho L, Ismars de Souza H, Lacerda Nascimento A, Uddin M, Sérgio Pereira P, Nascimento Silva Teixeira D, Roberto da Silva P, Alves de Albuquerque D, Helena Faccioli L, de Paula Rogério A, (2020). Dermatophagoides pteronyssinus-induced pro-inflammatory responses mediated via STAT3 and NF-kappaB signaling pathways in human bronchial epithelial cells – Inhibitory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid. *J Pharmacol Sci*, 142: 157–164.
- Kehili N, Saka S, Aouacheri O, (2017). L'effet phytoprotecteur de la nigelle (*Nigella sativa*) contre la toxicité induite par le cadmium chez les rats. *Phytothérapie*, DOI: 10.1007/s10298-017-1099-y.
- Keirns BH, Lucas EA, Smith BJ, (2020). Phytochemicals affect T helper 17 and T regulatory cells and gut integrity: implications on the gut-bone axis. *Nutr Res*, 83, 30-48.
- Kim J-E, Park K-M, Lee S-Y, Seo J-H, Yoon I-S, Bae C-S, Yoo J-C, Bang M-A, Cho, S-S, Park D-H, (2017). Anti-inflammatory effect of *Allium hookeri* on carrageenan-induced air pouch mouse model. *PLoS One* 12: e0190305.
- Kim MS, Yi JM, Kim SH, Hong SH, Kim HM, (2004). Madimadi, Korean folk medicine, blocks TNF- α , IL-1 β , and IL-8 production by activated human immune cells. *Cytokines*, 25: 179–186.
- Kim Y, Seok JH, Cheung W, Lee S, Jang HH, Bae S, Lee H, (2019). Effects of *Helichrysum bracteatum* flower extracts on UVB irradiation-induced inflammatory biomarker expression. *Biomed Dermatol*, 3(9): 1–6.
- Krimat S, Metidji H, Tigrine C, Dahmane D, Nouasri A, Dob T, (2017). Chemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and cytotoxic activities of hydromethanolic extract of *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, DOI: 10.1007/s10298-017-1134-z.

- Kumar D, Yusuf MA, Singh P, Sardar M, Sarin NB, (2014). Histochemical Detection of Superoxide and H₂O₂ Accumulation in *Brassica juncea* Seedlings. *Bio-protocol*, 4: e1108.
- Kumar T, Jain V, (2014). Antinociceptive and anti-Inflammatory activities of *Bridelia retusa* methanolic fruit extract in experimental animals. *Sci World J*, 2014: 890151.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC, (2020). Inflammation and repair. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, p. 57–96.
- Küpeli E, Tosun A, Bahadır Ö, (2006). Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Helichrysum gaertner* species (Asteraceae). *Turk J Pharm Sci*, 3: 141–149.
- Kurutas EB, (2016). The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr. J*, 15(1), 1-22.
- Lavault M, Richomme P, (2004). Constituents of *Helichrysum stoechas* variety *olonnense*. *Chem Nat Compd*, 40(2): 118–121.
- Lawrence T, Gilroy DW, (2007). Chronic inflammation: a failure of resolution?. *Int J Exp Pathol*, 88(2): 85–94.
- Les F, Venditti A, Cásedas G, Frezza C, Guiso M, Sciubba F, Serafini M, Bianco A, Valero MS, López V, (2017). Everlasting flower (*Helichrysum stoechas* Moench) as a potential source of bioactive molecules with antiproliferative, antioxidant, antidiabetic and neuroprotective properties. *Ind Crops Prod*, 108: 295–302.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, Jiang Y, (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem*, 102(3): 771–776.
- Li S, Hong M, Tan HY, Wang N, Feng Y, (2016). Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 4234061.
- Lima JrH, Jacobson L, Goldberg M, Chandran K, Diaz-Griffero F, Lisanti MP, Brojatsch J, (2013). Role of lysosome rupture in controlling Nlrp3 signaling and necrotic cell death. *Cell Cycle*, 12: 1868–1878.
- Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME, (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*, 674(1-2): 137–147.
- Liu F, Liao S, Zou Y, Xiao G, (2014). Antioxidant activity of *Phellinus igniarius* extracts. *The FASEB journal*, 28(1): 830–832.
- Lovell MA, Markesbery WR, (2007). Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res*, 35(22): 7497–504.

- Lowe DB, Storkus WJ, (2011). Chronic inflammation and immunologic-based constraints in malignant disease. *Immunotherapy*, 3(10): 1265–1274.
- Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L, (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol Chem*, 395(2), 203–230.
- Madan S, Prashant S, Neeraj U, Yogesh S, (2011). *In-vitro* Anti-arthritic Activity of *Manilkara zapota* Linn. *Asian J Pharm Tech*, 1(4): 123–124.
- Magalingam KB, Radhakrishnan A, Haleagrahara N. (2016). Protective effects of quercetin glycosides, rutin, and isoquercetrin against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 29(1): 30–39.
- Mahmoudi S, Khali M, Mahmouidi N, (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus L.*). *Revue « Nature & Technologie ». B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, 09: 35–40.
- Makris DP, Boskou D, (2014). Plant-Derived Antioxidants as Food Additives. In *Plants as a Source of Natural Antioxidants*; CABI. Oxfordshire, UK, 169-190.
- Mallem Y, Gogny M, (2014). Anti-inflammatoires en médecine vétérinaire. *EMC-Vétérinaire*. DOI : 10.1016/S1283-0828(13)35976-6
- Manga HM, Brkic D, Marie DEP, Quetin-Leclercq J, (2004). *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). *J Ethnopharmacol*. 92(2): 209–214.
- Mao Z, Gan C, Zhu J, Ma N, Wu L, Wang L, Wang X, (2017). Anti-atherosclerotic activities of flavonoids from the flowers of *Helichrysum arenarium* L. MOENCH through the pathway of anti-inflammation. *Bioorg Med Chem Lett*, 27(12): 2812–2817.
- Marchiani A, Rozzo C, Fadda A, Delogu G, Ruzza P, (2014). Curcumin and curcumin-like molecules: from spice to drugs. *Curr Med Chem*, 21(2): 204–222.
- 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.
- Marliyah M, Ananthi T, (2015). *In vitro* anti-inflammatory activity of seed extract of *Zea Mays* (L.). *J. J Glob Biosci*, 4(5): 2168–2173.
- Marston A, Hostettmann K, (2006). Separation and quantification of flavonoids. IN *Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications*, eds. Andersen Ø, Markham KR, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA. pp 1–37.
- Matić IZ, Aljančić I, Žižak Ž. Vajs V, Jadranin M, Milosavljević S, Juranić ZD, (2013). *In vitro* antitumor actions of extracts from endemic plant *Helichrysum zivojinii*. *BMC Complement Altern Med*, 13: 36.

- Medzhitov R, (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203): 428–435.
- Menvielle-Bourg FJ, (2005). La superoxyde dismutase, puissant antioxydant naturel, désormais disponible par voie orale. *Phytotherapie*, 3: 118–121.
- Michel F, Bonnefond-Rousselot D, Mas E, Draï J, Théron P, (2008). Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Ann Biol Clin*. 66(6): 605–620.
- Migdal C, Serres M, (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Med Sci (Paris)*, 27(4): 405–412.
- Mihara M, Uchiyama M, (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, *Anal Biochem*, 86: 271–278.
- Misra DS, Maiti R, Ghosh D, (2009). Protection of swimming induced oxidative stress in some vital organs by the treatment of composite extract of *Withania somnifera*, *Ocimum sanctum* and *Zingiber officinalis* in male rat. *Afr J Tradit Compl Altern Med*, 6: 534–543.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB, (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*, 20(7), 1126–1167.
- Mohar DS, Malik S, (2012). The Sirtuin System: The Holy Grail of Resveratrol?. *J Clin Exp Cardiol*, 3(11): 216.
- Mounnissamy VM, Kavimani S, Balu V, Quine SD, (2007). Evaluation of Anti-inflammatory and Membrane stabilizing property of Ethanol Extract of *Cassia sophera* L. *J. Gmelin (Opiliaceae)*. *iums-ijpt*, 6(2): 235–230.
- Moure A, Cruz JM, Franco D, Manuel Dominguez J, Sineiro J, Dominguez H, Nunez MJ, Carlos Parajo J, (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem*, 72(2): 145–171.
- Moutia M, El Azhary K, Elouaddari A, Al Jahid A, Jamal Eddine J, Seghrouchni F, Habti N, Badou A, (2016). *Capparis Spinosa* L. promotes anti-inflammatory response in vitro through the control of cytokine gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Immunol*, 17: 26.
- Müller HE, (1985). Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidase medium. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*. 259(2): 151–154.
- Murtaugh MP, (1994). Porcine cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*, 43(1): 37–44.
- Nailwal NP, Doshi GM, (2021). Role of intracellular signaling pathways and their inhibitors in the treatment of inflammation. *Inflammopharmacology*, 29(3):617–640.

- Nanda BL, Nataraju A, Rajesh R, Rangappa KS, Shekar MA, Vishwanath BS, (2007). PLA2 mediated arachidonate free radicals: PLA2 inhibition and neutralization of free radicals by antioxidants – a new role as anti-inflammatory molecule. *Curr Top Med Chem*, 7(8): 765–777.
- Noack M, Kolopp-Sarda MN, (2018). Cytokines et inflammation: physiologie, physiopathologie et utilisation thérapeutique. *Rev Francoph Lab*, 2018(499): 28–37.
- Noorafshan A, Ashkani-Esfahani S, (2013). A review of therapeutic effects of curcumin. *Curr Pharm Des*, 19(11): 2032–2046.
- Norian R, Delirezh N, Azadmehr A, (2015). Evaluation of proliferation and cytokines production by mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Res Forum an Int Q J*, 6: 265–271.
- O’Flaherty C, (2015). Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian J. Androl*, 17(4), 583.
- Okoli CO, Akah PA, Nwafor SV, Anisiobi AI, Ibegbunam IN, Erojikwe O, (2007). Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. *J Ethnopharmacol*, 109: 219–225.
- Oliveira AS, Cercato LM, de Santana Souza MT, Melo AJ de O, Lima B dos S, Duarte MC, Araujo AA de S, de Oliveira e Silva AM, Camargo EA, (2017). The ethanol extract of *Leonurus sibiricus* L. induces antioxidant, antinociceptive and topical anti-inflammatory effects. *J Ethnopharmacol*, 206: 144–151.
- Oliveira RB, Chagas-Paula DA, Secatto A, Gasparoto TH, Faccioli LH, Campanelli AP, Da Costa FB, (2013). Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. *Rev Bras Farmacogn*, 23: 497–505.
- Olszowy M, Dawidowicz AL, (2016). Essential oils as antioxidants: their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods. *Monatsh Chem*, 147: 2083–2091.
- Onaran M, Orhan N, Farahvash A, Ekin HN, Kocabıyık M, Gönül İI, Aslan M, (2016). Successful treatment of sodium oxalate induced urolithiasis with *Helichrysum flowers*. *J Ethnopharmacol*, 186, 322-328.
- Panicker VP, George S, Dhanush Krishna B, (2014). Toxicity study of butylated hydroxyl toluene (BHT) in rats. *World J Pharm Pharm Sci*, 3(8): 758–763.
- Paraje MG, Barnes AI, Albesa I, (2005). An *Enterobacter cloacae* toxin able to generate oxidative stress and to provoke dose-dependent lysis of leukocytes. *Int J Med Microbiol*. 295(2): 109–116.
- Parakash D, Upadhyay G, Brahma N, Singh HB, (2007). Singh antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agriwostes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chem*, 104: 783–90.

- Pereira CG, Barreira L, Bijttebier S, Pieters L, Neves V, Rodrigues MJ, Rivas R, Varela J, Custódio L, (2017). Chemical profiling of infusions and decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and *in vitro* biological activities comparatively with green tea (*Camellia sinensis*) and rooibos tisane (*Aspalathus linearis*). *J Pharm Biomed Anal*, 145: 593–603.
- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L, (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J. Clin. Biochem*, 30, 11-26.
- Pinkus R, Weiner LM, Daniel V, (1996). Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression. *J. Biol. Chem.* 271(23), 13422–13429.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M, (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269(2): 337–341.
- Pruchniak MP, Kotuła I, Manda-Handzlik A, (2015). Neutrophil extracellular traps (Nets) impact upon autoimmune disorders. *Cent Eur J Immunol*, 40(2), 217-224.
- Quatrini L, Ugolini S, (2021). New insights into the cell- and tissue-specificity of glucocorticoid actions. *Cell Mol Immunol*, 18(2): 269–278.
- Que F, Mao L, Pan X, (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Res Int*, 39: 581–587.
- Quezel P, Santa S, (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition Centre national de la recherche scientifique, Tome II.
- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K, (2014). Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay. *Biomed Res Int*, 2014: 761264.
- Rahman S, Ansari RA, Rehman H, Parvez S, Raisuddin S, (2011). Nordihydroguaiaretic Acid from Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Mitigates 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced Inflammatory and Oxidative Stress Responses of Tumor Promotion Cascade in Mouse Skin. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011: 734785.
- Raja S, Ahamed K, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadhyay A, Mukherjee P, (2007). Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *J Ethnopharmacol*, 109(1): 41–47.
- 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(9-10): 1231–1237.
- Reimund JM, (2002) Stress oxydant au cours des syndromes inflammatoires chroniques. *Nutr. Clin.Metab.*16, 275–284.

- Rohit Y, Saurabh R, Ajay S, (2012). Review On Antioxidants Activity And Its Evaluation. *J Pharma Res*, 1(2): 41–58.
- Rossary A, Steghens JP, (2013). Marqueurs biologiques du stress oxydant. *Biologie médicale*, 8(4), 2013.
- Roumeliotis S, Roumeliotis A, Dounousi E, Eleftheriadis T, Liakopoulos V, (2019). Dietary antioxidant supplements and uric acid in chronic kidney disease: a review. *Nutrients*, 11(8), 1911.
- Roussis V, Tsoukatou M, Chinou IB, Harvala C, (2002). Composition and antibacterial activity of the essential oils of two *Helichrysum stoechas* varieties growing in the Island of Crete. *J. Essent. Oil Res*, 14(6), 459-461.
- Saffoon N, Uddin R, Subhan N, Hossain H, Reza HM, Alam MA, (2014). *In vitro* antioxidant activity and HPLC-DAD system based phenolic content analysis of *Codiaeum variegatum* found in Bangladesh. *Adv Pharm Bull*, 4(2): 533–541.
- Saha S, Verma RJ, (2015). Antioxidant activity of polyphenolic extract of *Phyllanthus emblica* against lead acetate induced oxidative stress. *Toxicol Environ Health Sci*, 7: 82–90.
- Sakat SS, Tupe PN, Juvekar AR, (2009). *In vitro* anti-inflammatory activity of aqueous and methanol extracts of *Erythrina indica* lam leaves. *Pharmacologyonline* 3: 221–229.
- Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P, (2011). A Review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 25-41.
- Santos AL, Sinha S, Lindner AB, (2018). The good, the bad, and the ugly of ROS: new insights on aging and aging-related diseases from eukaryotic and prokaryotic model organisms. *Oxid Med Cell Longev*, 2018.
- Scheen AJ, (2022). Les médicaments anti-inflammatoires : des anciens classiques aux biothérapies et inhibiteurs de JAK [Anti-inflammatory drugs : from old classical ones to biotherapies and JAK inhibitors]. *Rev Med Liege*, 77(5-6), 399–409.
- Schmölz L, Birringer M, Lorkowski S, Wallert M, (2016). Complexity of vitamin E metabolism. *World J Biol Chem*. 7(1): 14–43.
- Seo CS, Jeong SJ, Yoo SR, Lee NR, HK, (2016). Quantitative analysis and *in vitro* anti-inflammatory effects of gallic acid, ellagic acid, and quercetin from *Radix sanguisorbae*. *Pharmacogn Mag*, 12: 104–108.
- Setty AR, Sigal LH, (2005). Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. *Semin Arthritis Rheum*, 34(6): 773–784.
- Sevgi K, Tepe B, Sarikurkcu C, (2015). Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food Chem Toxicol*, 77: 12–21.

- Sharififar F, Dehghn-Nudeh G, Mirtajaldini M, (2009). Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. *Food Chem*, 112 (4): 885–888.
- Sharma GN, Gupta G, Sharma P, (2018). A comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*, 28(2).
- Sharma P, Ravikumar G, Kalaiselvi M, Gomathi D, Uma C, (2013). *In vitro* antibacterial and free radical scavenging activity of green hull of *Juglans regia*. *J Pharm Anal*, 3(4): 298–302.
- Si C-L, Lu Y-Y, Zhang Y, Xu J, Qin P-P, Sun R-C, Ni Y-H, (2011). Antioxidative low molecular weight extractives from triploid *Populus tomentosa* xylem. *Bioresources*, 6: 232–42.
- Silva JB, Temponi VS, Gasparetto CM, Fabri RL, Aragão DMO, Pinto NCC, Ribeiro A, Scio E, Glauciemar DVV, de Sousa OV, Alves MS, (2013). *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae): A promising source of antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*, 2013: 1–9.
- Silva L, Rodrigues AM, Ciriani M, Falé PLV, Teixeira V, Madeira P, Machuqueiro M, Pacheco R, Florêncio MH, Ascensão L, Serralheiro MLM, (2017). Antiacetylcholinesterase activity and docking studies with chlorogenic acid, cynarin and arzanol from *Helichrysum stoechas* (Lamiaceae). *Med Chem Res*, 26, 2942-2950.
- Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, Dmitriev AA, (2019). ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2019: 6175804–6175804.
- Sobhy EA, El-Feky SS, (2007). Chemical constituents and antimicrobial activity of *Helichrysum stoechas*. *Asian J Plant Sci*, 6:692–5.
- Soehnlein O, Lindbom L, (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10(6): 427–439.
- Sokół-Łętowska A, Oszmiański J, Wojdyło A, (2007). Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food Chem*, 103: 853–859.
- Sosa S, Pace R, Bornanciny A, Morazzoni P, Riva A, Tubaro A, Loggia RD, (2007). Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. *J Pharm Pharmacol*, 59: 703–709.
- Soubrier M, Rosenbaum D, Tatar Z, (2013). Antiinflammatoires non stéroïdiens et vaisseaux. *Rev Rhum*, 80(3): 204–208.
- Souza HP, Laurindo FR, Ziegelstein RC, Berlowitz CO, Zweier JL, (2010). Vascular NAD(P)H oxidase is distinct from the phagocytic enzyme and modulates vascular reactivity control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280(9): 658–667.
- Speciale A, Chirafisi J, Saija A, Cimino F. (2011). Nutritional antioxidants and adaptive cell responses: an update. *Curr. Mol. Med*, 11(9): 770–789.

- 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.
- Sumathi S, Anuradha R, (2016). *In vitro* anti-inflammatory activity of flower extract of *Couroupita guianensis* Aubl. *Int J Herb Med*, 4(5): 05–08.
- Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB, (2003). Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem*, 278(26), 24233–24241.
- Tarahovsky YS, Kim YA, Yagolnik EA, Muzafarov EN, (2014). Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. *Biochim Biophys Acta-Biomembr*, 1838: 1235–1246.
- Taşkın T, Gezmiş T, Çam ME, Taşkın, D, Çelik BÖ, Şenkardeş İ, Süzgeç-Selçuk S, (2020). The *in vitro* and *in vivo* investigation of biological activities and phenolic analysis of *Helichrysum plicatum* subsp. *plicatum*. *Braz J Pharm Sci*, 56(18345): 1–10.
- Tessier F, Marconnet P, (2015). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Sci Sports*. 10(16): 1–13.
- Tovmasyan A, Maia CG, Weitner T, Carballal S, Sampaio RS, Lieb D, Batinic-Haberle I, (2015). A comprehensive evaluation of catalase-like activity of different classes of redox-active therapeutics. *Free Radic. Biol. Med*, 86, 308-321.
- Trabut L, (2006). Noms indigènes des plantes d'Afrique du Nord. Edition Ibis Press, Paris. p 127.
- Uriu-Adams JY, Keen CL, (2005). Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med*, 26(4-5), 268-298.
- Vachali PP, Li B, Besch BM, Bernstein PS, (2016). Protein-Flavonoid Interaction Studies by a Taylor Dispersion Surface Plasmon Resonance (SPR) Technique: A Novel Method to Assess Biomolecular Interactions. *Biosens*, 6(1): 6.
- Velloso JCR, Regasini LO, Khalil NM, Bolzani V da S, Khalil OAK, Manente FA, Pasquini Netto H, Oliveira OMM de F, (2011). Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. *Eclética Química*. 36(2): 07–20.
- Weill B, Batteux F, (2003). Immunopathologie et réactions inflammatoires. Eds, *De Boeck Université* (Paris), 12–23.
- Yang H-L, Korivi M, Lin M-K, Chang HC-W, Wu C-R, Lee M-S, Chen WT-L, Hseu Y-C, (2017). Antihemolytic and antioxidant properties of pearl powder against 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced hemolysis and oxidative damage to erythrocyte membrane lipids and proteins. *J Food Drug Anal*, 25: 898–907.

- Yoon JH, Baek SG, (2005). Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties, *Yonsie Med J*, 46(5): 585–596.
- Yoon JH, Youn K, Ho CT, Karwe MV, Jeong WS, Jun M, (2014). *p*-Coumaric acid and ursolic acid from *Corni fructus* attenuated β -amyloid(25-35)-induced toxicity through regulation of the NF- κ B signaling pathway in PC12 cells. *J Agric Food Chem*, 62, 4911–4916.
- Zeinali M, Rezaee SA, Hosseinzadeh H, (2017). An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomed Pharmacother*, 92: 998–1009.
- Zelko IN, Marian TJ, Folz RJ, (2013). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med*, 33(3): 337–349.
- Zengin G, Cvetanović A, Gašić U, Tešić Ž, Stupar A, Bulut G, Sinan KI, Uysal S, Picot-Allain MCN, Mahomoodally MF, (2020). A comparative exploration of the phytochemical profiles and bio-pharmaceutical potential of *Helichrysum stoechas* subsp. *barrelieri* extracts obtained via five extraction techniques. *Process Biochem*, 91: 113–125.
- Zhang BB, Zhao K, He WQ, Wang D, Zang D, Chen K, Wang G, Gao F, (2011). Study on optimal condition of MTT in PBMC transformation. *Progress Vet Med*, 3: 65–68.
- Zhang Q, Li N, Zhou G, Lu X, Xu Z, Li Z, (2003). *In vivo* antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanesis* (Rhodophyta) in aging mice. *Pharmacol Res*, 48(2): 151–155.
- Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler AC, Best TM, (2015). Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly. *Acta physiologica*, 214(3), 329-348.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى معرفة التركيبة الكيميائية وتقييم النشاط المضاد للالتهاب والمضاد للأكسدة لكل من مستخلص اسيتات الايثيل والوتانول لبنتة *Helichrysum stoechas* Moench (L.). بينت الدراسة الكيميائية ان مستخلص اسيتات الايثيل يحتوي على أعلى كمية من المركبات الفينولية والفلافونويدات. كما بين تحليل LC-ESI-MS وجود الإيزوكبرستين، الروتين، حمض الفيروليك و حمض الكلوروجينيك في كلا المستخلصين. أظهرت المعالجة موضعية للفقران ب 2 مغ/للأذن من مستخلص اسيتات الايثيل والوتانولي تثبيطاً لالتهاب الأذن المخفزة بزيت Croton بنسب تراوحت بين 86% و 64%. كما أدت معالجة الفقران ب 1 مغ/مل من مستخلص اسيتات الايثيل والوتانولي إلى انخفاض معتبر لهجرة الخلايا المتعادلة نحو موقع الالتهاب، حيث تراوحت نسبة التثبيط بين 84% و 66%. بينت تجارب الزجاج أن حضان الخلايا المخفزة ب *Concanavaleine A* مع تراكيز مختلفة (1، 10، 50، 100 مغ/مل) للمستخلصين إلى انخفاض افراز السيتوكين المخفز للالتهاب (IL-17A) و ارتفاع افراز السيتوكين المضاد للالتهاب (IL-10). ثبت للمستخلصين تحلل الكريات الدموية الحمراء بنسب بين 90-98% كما ثبت إتلاف بروتين الألبومين بقيم IC_{50} قدرت ب $4,17 \pm 101,20$ مغ/مل و $0,76 \pm 93,79$ مغ/مل، على التوالي. من جهة أخرى، تم تقدير النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصين باستعمال عدة تقنيات في الكائن الحي وفي الزجاج. أدت المعالجة اليومية للفقران عن طريق الفم ب 75، 150 و 300 مغ/كغ من المستخلصين خلال 21 يوم إلى تحسّن مؤشرات الاجهاد التأكسدي (SOD, CAT, GSH, MDA) على مستوى النسيج الكبدى. بينت النتائج المتحصل عليها أن مستخلص اسيتات الايثيل والوتانولي يمتلكان قدرة ازاحية عالية مضادة لكل من جذر DPPH ($IC_{50} = 5,07$ ، $0,36 \pm 22,64$ و $1,61 \pm 22,64$ مغ/مل)، $ABTS^{+}$ ($IC_{50} = 4,08 \pm 0,06$ و $10,11 \pm 0,44$ مغ/مل)، جذر الهيدروكسيل ($IC_{50} = 179,31 \pm 2,01$ و $263,88 \pm 4,59$ مغ/مل)، فوق أكسيد الهيدروجين ($IC_{50} = 54,82 \pm 1,50$ و $83,67 \pm 1,02$ مغ/مل) و بيروكسيد الهيدروجين ($IC_{50} = 1,34 \pm 0,12$ و $2,00 \pm 0,17$ مغ/مل). كما ابدى هذين المستخلصين فعالية ارجاع جد معتبرة. ثبت كلا المستخلصين أكسدة حمض اللينولييك بنسب تراوحت بين 82 و 87%. بالإضافة إلى ذلك، فقد ثبت ان كلا المستخلصين لهما تأثير وقائي كبير ضد تحلل كريات الدم الحمراء الناجم عن AAPH، مع زيادة في زمن نصف انحلال الدم (HT_{50}) بشكل مرتبط بالتركيز. بلغت قيمة HT_{50} المسجلة $185,58 \pm 7,45$ دقيقة و $138,50 \pm 1,57$ دقيقة لمستخلص اسيتات الايثيل او الوتانولي بتركيز 40 ميكروغرام/مل، مقارنة ب $52,30 \pm 0,31$ دقيقة للعينات غير المعالجة. كخلاصة، يمكن اعتبار *Helichrysum stoechas* (L.) Moench مصدراً واعداً لمضادات الالتهاب ومضادات الأكسدة.

الكلمات المفتاح: مضادات الالتهاب، مضادات الأكسدة، *Helichrysum stoechas*، الإجهاد التأكسدي، المركبات الفينولية.

Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude phytochimique et l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des extraits d'acétate éthylique (E.AE) et butanolique (E.But) de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench. L'étude phytochimique a montré que l'E.AE est le plus riche en polyphénols et en flavonoïdes. L'analyse par LC-ESI-MS a permis d'identifier l'isoquercétine, la rutine, l'acide férulique et l'acide chlorogénique dans les deux extraits. *In vivo*, le traitement local des souris par 2 mg/oreille d'E.AE ou d'E.But a inhibé l'inflammation induite par l'huile de croton avec 86%-64%. De même, Le traitement des souris par 1 mg/poche d'E.AE ou d'E.But a réduit significativement le nombre des leucocytes ayant migrés vers le site enflammé avec un taux de 84-66%. *In vitro*, l'incubation des monocytes-concanavaleine A stimulés, avec différentes concentrations (1, 10, 50, 100 µg/ml) des extraits a diminué la production de la cytokine pro-inflammatoire (IL-17A) et a augmenté la production de la cytokine anti-inflammatoire (IL-10). En outre, l'E.AE et l'E.But ont inhibé l'hémolyse des érythrocytes avec 90-98% et ont prévenu la dénaturation du BSA avec des IC_{50} de l'ordre de $101,20 \pm 4,17$ µg/ml et $93,79 \pm 0,76$ µg/ml, respectivement. Les effets antioxydants des extraits étudiés ont été évalué en utilisant plusieurs tests *in vivo* et *in vitro*. L'administration quotidienne par voie orale de 75, 150 et 300 mg/kg de l'E.AE ou l'E.But durant 21 jours chez la souris a entraîné une amélioration des marqueurs du stress oxydatif (GSH, CAT, SOD et MDA) au niveau du tissu hépatique. Les résultats obtenus *in vitro* montrent que l'E.AE et l'E.But exercent une forte activité antiradicalaire vis-à-vis des radicaux DPPH ($IC_{50} = 5,07 \pm 0,36$ et $22,64 \pm 1,61$ µg/ml), $ABTS^{+}$ ($IC_{50} = 4,08 \pm 0,06$ et $10,11 \pm 0,44$ µg/ml), radical hydroxyle ($IC_{50} = 179,31 \pm 2,01$ et $263,88 \pm 4,59$ µg/ml), anion superoxyde ($IC_{50} = 54,82 \pm 1,50$ et $83,67 \pm 1,02$ µg/ml) et peroxyde d'hydrogène ($IC_{50} = 1,34 \pm 0,12$ et $2,00 \pm 0,17$ µg/ml). De même, les extraits étudiés ont présenté un bon pouvoir réducteur concentration dépendant et inhibent l'oxydation de l'acide linoléique avec des pourcentages de 82-87%. De plus, les deux extraits ont exercé un effet protecteur important contre l'hémolyse érythrocytaire induite par l'AAPH, avec une bonne corrélation entre la dose et le temps de demi-hémolyse (HT_{50}). La valeur HT_{50} obtenue est de $185,58 \pm 7,45$ min et $138,50 \pm 1,57$ min pour l'E.AE et l'E.But respectivement, à une concentration de 40 µg/ml, contre $52,30 \pm 0,31$ min pour le contrôle. En conclusion, cette étude a permis de montrer les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes très prometteuses des extraits de *Helichrysum stoechas* (L.) Moench.

Mots clés: Anti-inflammatoire, Antioxydant, *Helichrysum stoechas*, Stress oxydatif, Polyphénols.

Abstract

The aim of this study is to determine the phytochemical composition and to evaluate the anti-inflammatory and the antioxidant activities of ethyl acetate (EAE) and butanolic (BuE) extracts of *Helichrysum stoechas* (L.) Moench. The phytochemical study showed that EAE is the richest in polyphenols and flavonoids. LC-ESI-MS analysis allowed the identification of isoquercitrin, rutin, ferulic acid and chlorogenic acid in the two extracts. *In vivo*, the local treatment of mice by 2 mg/ear of EAE or BuE inhibited croton oil induced ear edema with 86-64%. Similarly, the treatment of rats with 1mg/pouch of EAE or BuE decreased significantly the number of leucocytes migrated to inflammation site with 84-66%. *In vitro*, our results showed that the incubation of concanavalin A stimulated monocytes with different concentrations (1, 10, 50, 100 µg/ml) of the extracts reduce the release of the pro-inflammatory cytokine (IL-17A) and increase the release of the anti-inflammatory one (IL-10). Moreover, the EAE and BuE extracts inhibited the erythrocytes hemolysis by 90-98% and prevented BSA denaturation with IC_{50} values of $101,20 \pm 4,17$ µg/ml and $93,79 \pm 0,76$ µg/ml, respectively. The antioxidant effect of the studied extracts was evaluated using different assays *in vivo* and *in vitro*. The daily oral administration of 75, 150 and 300 mg/kg of EAE or BuE during 21 days showed an improvement in the status of oxidative stress markers (GSH, CAT, SOD and MDA) in liver tissue. The results obtained *in vitro* showed that EAE and BuE exert a high antiradical activity against DPPH ($IC_{50} = 5,07 \pm 0,36$ and $22,64 \pm 1,61$ µg/ml), $ABTS^{+}$ ($IC_{50} = 4,08 \pm 0,06$ and $10,11 \pm 0,44$ µg/ml), hydroxyl radical ($IC_{50} = 179,31 \pm 2,01$ and $263,88 \pm 4,59$ µg/ml), superoxide anion ($IC_{50} = 54,82 \pm 1,50$ and $83,67 \pm 1,02$ µg/ml) and hydrogen peroxide ($IC_{50} = 1,34 \pm 0,12$ and $2,00 \pm 0,17$ µg/ml) radicals. The studied extracts showed a good concentration dependent reducing power and inhibited linoleic acid oxidation by 82-87%. In addition, both extracts exerted a significant protective effect against AAPH-induced erythrocyte hemolysis, with a good correlation between concentration and half-hemolysis time (HT_{50}). The recorded HT_{50} value reached $185,58 \pm 7,45$ min and $138,50 \pm 1,57$ min for EAE and BuE at a concentration of 40 µg/ml, versus $52,30 \pm 0,31$ min for the control. In conclusion, this study revealed a very promising anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum stoechas* extracts.

Key words: Anti-inflammatory, Antioxidant, *Helichrysum stoechas*, Oxidative stress, Polyphenols.