

UNIVERSITE DE MUSTAPHA STAMBOULI –MASCARA-

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie-microbiologie et Sécurité Sanitaire

THESE DE DOCTORAT LMD 3^{ème} CYCLE

En Sciences Biologiques

Option : Sciences, Technologie et Santé

**Effet des biomolécules extraites à partir de différentes plantes
de la région de Mascara : Evaluation biochimique des marqueurs
d'ostéoarticulation et de l'activité biologique**

Présentée par

Mr. BELKHODJA Hamza

Devant le jury

Président	BENABDELI Khaloufi	Professeur	Université de Mascara
Examinatrice	TIR TOUIL Aicha	Professeur	Université de Mascara
Examinatrice	HARIR Nouria	Maitre de conférences A	Université de SBA
Examineur	ABOUNI Bouziane	Professeur	Université de SBA
Examineur	BACHIR RAHO Ghalem	Maitre de conférences A	Université de Mascara
Encadreur	MEDDAH Boumediene	Professeur	Université de Mascara

Année Universitaire : 2015-2016

Remerciement

Tout d'abord je remercie « DIEU » le tout puissant qui nous a donné le courage et l'ambition pour réaliser ce travail modeste.

Je veux exprimer ici, ma respectueuse gratitude à M^f **BENABDELI Khaloufi**, Professeur à l'Université de Mascara, d'avoir accepté de présider ce jury.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à M^{me} **HARIR Nouria**, MCA à l'Université de Sidi Bel Abbes, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner cette thèse.

J'exprime mes vifs remerciements également à M^{me} **MEDDAH TIR TOUIL Aicha**, Professeur à l'Université de Mascara. C'est une grande joie de vous compter parmi les membres de mon jury de thèse. Je vous adresse mes plus chaleureux remerciements.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements à M^f **ABOUNI Bouziane**, Professeur à l'Université de Sidi Bel Abbes, pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de jury.

Que M^f **BACHIR RAHO Ghalem**, MCA à l'Université de Mascara, a trouvé ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'il a bien voulu apporter à ce travail en acceptant de participer à ce jury.

Je profite de l'occasion qui m'est ainsi présentée pour exprimer à mon encadreur, Professeur **MEDDAH Boumediene**, ma respectueuse gratitude. Ses précieux conseils et ses encouragements ont permis le bon déroulement et l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je suis très reconnaissant envers le Professeur **ŞEKEROĞLU Nazim** ainsi que toute l'équipe du laboratoire de □plantes médicinales et aromatiques□, pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire à l'Université de Kilis (TURQUIE) pour faire une partie des tests biologiques.

Je voudrais également adresser mes remerciements à Monsieur le Professeur **SLIMANI Khaled** pour m'avoir aidé dans l'interprétation des analyses radiologiques.

J'exprime également mes sincères remerciements au personnel de l'animalerie, à mes collègues et à tous qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail aux personnes qui me sont les plus chères, ma très chère mère et mon père, je ne savais jamais comment exprimer mes sentiments pour leur sacrifice, tendresse et affection qu'ils ont toujours accomplis avec dévouement pour me permettre de réussir dans ma vie, je suis très reconnaissant à toutes les peines qu'ils se sont données pour mon éducation, l'expression de mon profond respect.

❖ A mon frère Mohamed, sa femme et leurs adorables enfants.

❖ A ma sœur Amel, son mari et mon adorable nièce Omaïma

❖ A ma sœur Chaimaa

❖ A mes amies: SIDE LARBI Khadouj, BELMIMOUN Asmaa, Fatima 1 et 2,

Kheira, Amina et toutes les filles de la 2^{ème} promotion de Doctorat

❖ A mes chers amis : Abdelkader, Ahmed, Ossama, Amine, Othmane, Wahid,....

Hamza

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction générale	1

Partie I

Etude bibliographique

Chapitre I. La physiopathologie des maladies ostéoarticulaires

1.1.Principaux composants de l'articulation.....	3
1.1.1. Tissu cartilagineux	3
1.1.2. Structure du cartilage hyalin	4
1.1.3. Matrice extracellulaire (MEC)	5
1.2.Arthrose et anormalités des structures articulaires	9
1.2.1. Définition	10
1.2.2. Étiologie de l'arthrose	10
1.2.3. Localisation de l'arthrose	11
1.2.4. Épidémiologie de l'arthrose	12
1.2.5. Facteurs de risque.....	12
1.2.5.1. Facteurs de risque systémiques	12
1.2.5.2. Facteurs de risques locaux	14
1.3.Diagnostic de l'arthrose	16
1.4.Biomarqueurs de l'arthrose	19
1.5.Prise en charge thérapeutique de l'arthrose	22
1.6.Traitements naturels.....	25

Chapitre II. Les plantes médicinales et les vertus de l'aromathérapie

2.1. Plantes médicinales	27
2.1.1. Définition	27
2.1.2. Éléments actifs des plantes médicinales.....	27
2.1.3. Plantes médicinales et systèmes de régulation	30
2.1.4. Utilisation historique des plantes médicinales en Algérie	31
2.2. Aromathérapie.....	32
2.2.1. Définitions	32
2.2.2. Procédés d'extraction des huiles essentielles	34
2.2.3. Structure chimiques des huiles essentielles	37
2.2.4. Propriétés fondamentales des huiles essentielles	38
2.2.5. Toxicité des huiles essentielles	39

Chapitre III. Notions sur les plantes étudiées

3.1. *Rosmarinus officinalis*

3.1.1. Etymologie	41
3.1.2. Classification du Romarin	41
3.1.3. Description botanique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	41
3.1.4. Composition chimique de <i>R. officinalis</i>	42
3.1.5. Vertus médicinales de Romarin	44

3.2. *Populus alba*

3.2.1. Etymologie	46
3.2.2. Classification du peuplier blanc	46
3.2.3. Description botanique de <i>Populus alba</i>	47
3.2.4. Ecologie	47
3.2.5. Utilisation du peuplier blanc	48
3.2.6. Propriétés thérapeutiques de <i>Populus alba</i>	48

Partie II

Etude Expérimentale

Chapitre I. Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Objectifs du travail	49
1.2. Présentation et situation de la zone de récolte	49
1.3. Matériel végétal	50
1.4. Animaux	51

2. Méthodes

2.1. Caractérisation physico-chimique des plantes étudiées	51
2.1.1. Détermination de la teneur en eau	51
2.1.2. Détermination de taux de cendres	52
2.2. Extraction des huiles essentielles	52
2.2.1. Détermination du rendement d'extraction	53
2.2.2. Caractérisation des huiles essentielles de <i>Rosmarinus officinalis</i> et <i>Populus alba</i>	54
2.2.2.1. Caractères sensorielles et indices physicochimiques	54
2.2.2.2. Analyse chromatographique CPG/SM	56
2.3. Test de toxicité aigüe	58
2.4. Test de tolérance cutanée (IP)	58
2.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles	61
2.5.1. Inflammation aigüe	61
2.5.2. Inflammation chronique	62
2.5.2.1. Prise du poids corporel et de la température rectale	65
2.5.2.2. Prise du poids des organes	66
2.5.2.3. Dosages des paramètres biochimiques	66

- Protéine C Réactive (CRP)	66
- Phosphatase alcaline (PAL)	66
- Calcium	67
- Créatinine	67
- Transaminases (TGO, TGP)	67
2.5.2.4. Analyse radiographique	68
2.5.2.5. Analyse histopathologique	70
2.6. Activité protectrice des huiles essentielles contre les dommages de l'ADN	72
2.7. Analyses statistiques	73

Chapitre II. Résultats et discussions

2.1. Caractérisation physico-chimique des plantes étudiées	74
2.1.1. Teneur en eau et taux de cendres.....	74
2.2. Analyses des huiles essentielles	75
2.2.1. Rendement d'extraction	75
2.2.2. Propriétés sensorielles et indices physicochimiques	76
2.2.3. Analyse chromatographique CPG/SM	78
2.3. Toxicité aiguë	82
2.3.1. Observations cliniques et survie des rats	82
2.3.2. Evolution du poids des rats.....	83
2.4. Test de tolérance cutanée (IP)	84
2.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles	86
2.5.1. Inflammation aiguë	86
2.5.2. Inflammation chronique	88
2.5.2.1. Evolution du poids corporel	88
2.5.2.2. Température rectale des rats	90
2.5.2.3. Poids des organes	91
2.5.2.4. Evolution des paramètres biochimiques	91
- Protéine C Réactive (CRP)	92
- Phosphatase alcaline (PAL)	93
- Calcium	94
- Créatinine	96
- Transaminases (TGO, TGP)	97
2.5.2.5. Mécanismes anti-inflammatoires de l'HE de <i>R. officinalis</i> et <i>P. alba</i>	98
2.5.2.6. Analyse radiographique	100
2.5.2.7. Analyse histopathologique	101
2.6. Activité protectrice des huiles essentielles contre les dommages de l'ADN	104
Conclusion générale.....	106
Références bibliographiques.....	108
Annexes	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Prévalence de l'arthrose en fonction de l'âge et de sexe	13
2	Quelques marqueurs potentiels de l'arthrose	20
3	Composants majoritaires d'huiles essentielles de l'espèce <i>Rosmarinus officinalis</i>	43
4	Les caractéristiques géographiques et bioclimatiques des sites de récolte	50
5	Appréciation de l'œdème et l'érythème selon l'échelle numérique du DRAIZE	60
6	Les différents traitements appliqués	61
7	Les différents traitements appliqués	63
8	Stades radiologiques de la gonarthrose	69
9	Rendement d'extraction	75
10	Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du romarin et peuplier blanc	76
11	La composition chimique de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	79
12	La composition chimique de l'huile essentielle de <i>Populus alba</i>	81
13	Mortalité des rats en fonction des doses administrées en huiles essentielles	83
14	L'indice d'irritation primaire de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> et de <i>P. alba</i>	85

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Coupe sagittale d'une articulation du genou	4
2	Structure de la matrice cartilagineuse	5
3	Les composantes du cartilage articulaire	7
4	Les principales étapes de l'évolution du cartilage articulaire et de l'ossification enchondrale	9
5	Les structures articulaires impliquées lors de l'arthrose	11
6	Montage d'hydrodistillation	34
7	Montage d'entraînement à la vapeur d'eau	35
8	Montage d'hydrodiffusion	35
9	Exemples de structures de monoterpènes	37
10	Exemples de structures de sesquiterpènes	37
11	Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane	38
12	Tige principale et rameau feuillé à fleurs du romarin	42
13	Feuilles et fruits de <i>Populus alba</i>	47
14	Carte géographique représentant les sites de récolte	50
15	La partie aérienne de <i>Rosmarinus officinalis</i> (A) et <i>Populus alba</i> (B)	51
16	Les étapes principales du test de tolérance cutanée (IP)	59
17	Injection de dextrans dans la région sub-plantaire de la patte du rat	62
18	Injection intra-articulaire d'une solution de mono-iodo acétate	64
19	La teneur en eau (H ₂ O%) et le taux de cendre (C%) des deux plantes étudiées	74
20	Les rendements d'extraction	75
21	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Rosmarinus officinalis</i>	78
22	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Populus alba</i>	80
23	Evolution du poids des rats traités durant les 14 jours d'observation	84
24	Evolution de l'épaisseur du pied des rats témoins et traités	87
25	Pourcentage d'inhibition du gonflement du pied des rats	88
26	Evolution du poids corporel chez les rats durant la période d'expérimentation	89
27	Evolution de la température rectale chez les rats, selon les différents traitements	90
28	Le poids des organes des rats normaux témoins et traités	91
29	Variations de la CRP chez les rats témoins et traités	92
30	Variations de la phosphatase alcaline (PAL) chez les rats témoins et traités	94
31	Variations de la Calcémie chez les rats témoins et traités	95
32	Variations de la Créatinine chez les rats témoins et traités	96
33	Variations de la TGP (ALAT) chez les rats témoins et traités	97
34	Variations de la TGO (ASAT) chez les rats témoins et traités	97
35	Radiographie des genoux des rats traités et non traités	100
36	Répartition radiographique des genoux des rats selon le score de Kellgren et Lawrence	101
37	Images de coupe frontale de l'articulation de genou après coloration HES (x100)	102
38	Score de Mankin obtenu chez les rats témoins et traités	103
39	Effet protectif de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> et <i>P. alba</i> contre l'oxydation de l'ADN du plasmide pBR322 par le peroxyde d'hydrogène / UV	104
Planches		
1	Aspects des HE des deux espèces	75
2	Aspect de la patte avant (A) et après traitement (B)	88

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR :	Association Française de Normalisation
AINS :	Anti-inflammatoire Non Stéroïdien
COMP :	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CPG / SM :	Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse
DDR2 :	Discoidin Domain-containing Receptor 2
DL₅₀ :	Dose Létale 50
ERO :	Espèces Réactives de L'oxygène
HE :	Huile (s) Essentielle (s)
IASP:	International Association for the Study of Pain
IL :	Interleukine
IP :	Indice Primaire
ISO :	International Organisation for Standardisation
MMP-13 :	Matrix MetalloPeptidase-13
MEC :	Matrice Extracellulaire
MIA :	Mono-Iodo Acétique
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PG :	Protéoglycane
TNF-α :	Facteur de nécrose tumorale- α (Tumor Necrosis Factor- α)

RESUME

L'Algérie par sa position géographique abrite une biodiversité exceptionnelle occupée par une importante richesse des plantes aromatiques et médicinales qui sont utilisées dans les remèdes traditionnels et qui ne sont pas évaluées scientifiquement. Le travail présenté dans cette thèse a pour objectif d'exploiter des composants bioactifs « Huiles essentielles » de l'espèce *Rosmarinus officinalis* (Lamiacées) et *Populus alba* (Salicacées) de la région de Mascara. Il porte sur l'étude de l'efficacité de ces composés dans le traitement d'une maladie sévère affectant la structure osseuse et la stabilité du cartilage articulaire et sur l'activité antioxydante des huiles essentielles des deux plantes pour inhiber les dommages de l'ADN induits par des radicaux libre.

L'extraction de l'huile essentielle de la partie aérienne des deux espèces par hydrodistillation a permis d'obtenir un rendement de $1,29 \pm 0,03\%$ pour le Romarin et $0,9 \pm 0,08 \%$ pour le Peuplier blanc. L'analyse chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) des huiles essentielles révèle que l'huile collective de *R. officinalis* est riche en camphre (22,35%), Verbénone (23,48%), Borneol (16,63%) et l'eucalyptol (11,73%). Alors que l'huile essentielle de *Populus alba* a présenté un niveau élevé de 1,8-Cineole (38,02%), β -Eudesmol (20,58%) et le δ -Cadinene (8,30%).

Les huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* ont montré une activité anti-inflammatoire significative à des degrés différents dans le modèle d'inflammation aiguë de la dextrane chez le rat. Ainsi, l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* a présenté une activité anti-inflammatoire dans le modèle d'arthrose induit par l'acide mono iodo acétique. Cette activité est exprimée par le rétablissement des valeurs des marqueurs biochimiques avec une certaine différence dans le degré d'influence. L'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* ont présenté une protection contre la scission de l'ADN induite par les radicaux OH^- générés à partir de la photolyse UV/ H_2O_2 .

Mots-clés : Extraction ; *Rosmarinus officinalis* ; *Populus alba* ; Huile essentielle ; Arthrose.

ABSTRACT

The Algeria's geographical position is home to an exceptional biodiversity occupied by a significant wealth of aromatic and medicinal plants, that are used in traditional medicines and which are not scientifically evaluated. The work presented in this thesis aims to exploit bioactive components "essential oils" of the species *Rosmarinus officinalis* (*Lamiaceae*) and *Populus alba* (*Salicaceae*) in the region of Mascara. It focuses on the study of the efficacy of these compounds in the treatment of severe disease affecting bone structure and stability of the articular cartilage and the antioxidant activity of essential oils from the both plants to inhibit the DNA damage induced by free radicals.

The essential oil extraction from the aerial part of the two species by hydrodistillation has afforded a yield of $1.29 \pm 0.03\%$ for the Rosemary and $0.9 \pm 0.08\%$ for white poplar. The analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS) of essential oils shows that collective essential oil of *R. officinalis* is rich in camphor (22.35%), Verbenone (23.48%), borneol (16.63%) and eucalyptol (11.73%). While the essential oil of *P. alba* presented a high level of 1,8-Cineole (38.02%), β -Eudesmol (20.58%) and δ -Cadinene (8.30%).

Essential oils of *R. officinalis* and *P. alba* showed a significant anti-inflammatory activity to different degrees in the acute inflammation model of dextran in rats. Thus, the essential oil of *R. officinalis* and *P. alba* presented an anti-inflammatory activity in the model of osteoarthritis induced by mono iodo acetic acid. This activity is expressed by the recovery of the values of biochemical markers with some difference in the degree of influence. The essential oil of *R. officinalis* and *P. alba* presented protection against DNA scission induced by OH⁻ radicals generated from photolysis UV / H₂O₂.

Keywords: Extraction; *Rosmarinus officinalis*; *Populus alba*; essential oil; Osteoarthritis.

الملخص

تتميز الجزائر باعتبار موقعها الجغرافي بتنوع نباتي مما يمكنها من احتواء ثروة مهمة من النباتات الطبية والعطرية التي تستخدم في الطب التقليدي، والتي لم يتم تقييمها علميا. العمل المقدم في هذه الأطروحة يهدف إلى استغلال المكونات النشطة بيولوجيا "الزيوت العطرية" من نبات إكليل الجبل (العائلة الشفوية) والحوار الأبيض (العائلة الصفصافية) في منطقة معسكر.

ويستند هذا العمل على دراسة فعالية هذه المركبات في علاج مرض شديد يؤثر على بنية العظم والاستقرار في الغضروف المفصلي وعلى دراسة نشاط الزيوت العطرية للنباتتين كمضادات للأكسدة لمنع الحمض النووي من التلف الناتج عن الجذور الحرة.

أعطى استخراج الزيت الأساسي من هذين النوعين عن طريق التقطير بالبخار مردود يقدر $1.29 \pm 0.03\%$ لإكليل الجبل و $0.9 \pm 0.08\%$ للحوار أبيض. التحليل الكروماتوغرافي إلى جانب قياس الطيف الكتلي للزيت الأساسي يظهر أن زيت إكليل الجبل غني بالكافور (22.35٪)، فيربينون (23.48٪)، بورنيول (16.63٪) ويوكالبتول (11.73٪).. في حين قدم زيت الحوار الأبيض مستوى عال من 1،8-سينول (38.02٪) يوديسمول (20.58٪) والكادنان (8.30٪).

وأظهرت الزيوت العطرية نشاطا مهما كمضادات للالتهابات بدرجات مختلفة في نموذج الالتهاب الحاد للديكستران عند الفئران. وكذلك أظهرت الزيوت العطرية نشاطا مهما كمضادات للالتهابات في نموذج هشاشة العظام الناجمة عن أحادية يودو حمض الخليك. ويتم التعبير عن هذا النشاط من خلال استرداد المؤشرات الحيوية لقيمها الطبيعية مع بعض الاختلاف في درجة التأثير. قدمت الزيوت العطرية حماية ضد انفصال الحمض النووي الناتج عن المركبات الجذرية الاوكسيجينية الناتجة من التحلل الضوئي للأشعة فوق البنفسجية والماء الاوكسيجيني.

كلمات البحث: استخلاص، إكليل الجبل، الحوار أبيض، الزيوت العطرية، التهاب المفصلي.

INTRODUCTION
GENERALE

Depuis plusieurs années, l'homme est habitué à utiliser les plantes pour leurs propriétés médicinales et nutritives. Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première destinée aux différents secteurs d'activité tels que : le cosmétique, la pharmacie, l'agroalimentaire, le phytosanitaire et l'industrie (Bahorun, 1997). Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes par manque d'accès aux médicaments prescrits mais aussi parce que les plantes ont pu démontrer une réelle efficacité. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques (Lhuillier, 2007).

La région méditerranéenne possède des zones biogéographiques parmi les plus rares au monde et une biodiversité de première importance avec beaucoup de plantes d'intérêt thérapeutique (Elayyachy *et al.*, 2006). Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel. En effet, ces plantes sont souvent caractérisées par la biosynthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle : « les huiles essentielles » connues depuis longtemps pour leurs activités thérapeutiques dans la médecine populaire. Les propriétés pharmacologiques des huiles essentielles ont été largement étudiées (Aslam *et al.*, 2011). L'étude des différentes activités analgésiques et anti-inflammatoires de ces molécules bioactives serait donc sollicitée pour le traitement des pathologies inflammatoires affectant la santé humaine citant comme exemple « l'arthrose ».

L'arthrose (OA) est une maladie articulaire qui résulte d'un système complexes d'interactions d'ordre mécanique, biologique, biochimique ou encore moléculaire (Martel-Pelletier, 2010). La dégénérescence du cartilage articulaire ayant pour origine la destruction de la matrice extracellulaire malgré la réparation des chondrocytes. Elles ciblent le rétablissement de l'équilibre homéostatique entre la synthèse et la dégradation des composants matriciels (Sandell, 2008). Cette dégénérescence est à l'origine de l'apparition de fibrillations, de fissures et d'ulcérations. Bien que la dégradation du cartilage soit une caractéristique de l'arthrose, l'inflammation de la membrane synoviale participe aussi à la pathologie de la maladie (Martel-Pelletier, 1999).

Cependant, malgré les recherches intensives ayant permis une meilleure compréhension de la maladie, il n'existe aucun traitement capable de l'arrêter à ce jour. Les traitements actuels sont des traitements symptomatiques n'affectant en rien sa progression. Ils ont pour effet seulement d'atténuer la douleur. C'est la raison pour que les recherches ont fait le recours au traitement par les plantes pour évaluer leur efficacité vis-à-vis ce type des pathologies.

Comme un autre type de maladies, le stress oxydatif, affectant la stase cellulaire. Ce phénomène est le résultat de la production excessive de radicaux libres. Elle se traduit par déplétion d'antioxydants et provoque un déséquilibre entre les radicaux libres et les défenses antioxydantes de l'organisme, ce qui peut causer des dommages au niveau moléculaire. (Hancock *et al.*, 2001).

C'est dans le but d'une meilleure valorisation des quelques espèces de plantes de la région de Mascara que la présente étude est réalisée. Il s'agit de l'espèce : *Rosmarinus officinalis* (Romarin) et *Populus alba* (Peuplier blanc). Elle a été conçue pour l'évaluation *in vivo* de l'efficacité des huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* dans le traitement des modèles expérimentaux induits par l'arthrose. La capacité des huiles essentielles de ces deux espèces pour inhiber les dommages de l'ADN induits par des radicaux libres a été également évaluée.

Ce manuscrit est organisé en trois parties principales :

- ➡ La première partie concerne une revue bibliographique présentant un rappel sur la physiologie des maladies ostéoarticulaires (chapitre I), les vertus des plantes médicinales (chapitre II) et la présentation des plantes étudiées (chapitre III).
- ➡ La deuxième partie présente les protocoles expérimentaux menés pour la mise en évidence des effets des huiles essentielles contre les troubles ostéoarticulaires et dans la protection de l'ADN cellulaire vis-à-vis l'oxydation provoquée par les radicaux libres.
- ➡ La troisième partie de ce manuscrit illustre les résultats obtenus ainsi que leurs interprétations à la lumière de la littérature.
- ➡ Enfin, une conclusion et perspectives qui clôturent le travail.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I.

**LA PHYSIOPATHOLOGIE DES
MALADIES OSTEOARTICULAIRES**

« Notre vie n'est que mouvement. »

Michel de Montaigne

1.1. Principaux composants de l'articulation

Une articulation est formée de deux os arrondis et superposés. Le glissement de l'un par rapport à l'autre permet un mouvement. Ces os sont recouverts d'un tissu cartilagineux qui permet d'éviter tout frottement mécanique entre eux et aussi de faciliter le mouvement par conséquent préserver l'os de l'usure. Une articulation n'est pas uniquement formée du cartilage articulaire, mais aussi de structures annexes comprenant le ménisque, les ligaments, et la membrane synoviale qui fait partie intégrante de l'articulation (Goldring, 2007).

1.1.1. Tissu cartilagineux

Le tissu cartilagineux est un tissu conjonctif d'origine mésenchymateuse à la fois solide et élastique qui recouvre les extrémités osseuses (Figure 1). Il est constitué d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, ainsi que de fibres et de substance fondamentale qui forment par définition la matrice extracellulaire (Hayes *et al.*, 2001). Le cartilage présente la particularité d'être non innervé et non vascularisé. L'articulation est délimitée par une membrane synoviale et un manchon fibreux appelé capsule qui renforce à l'extérieur la membrane synoviale. Des ligaments latéraux et parfois intra-articulaires, notamment dans le cas du genou, viennent stabiliser l'articulation. Le cartilage se trouve donc enfermé dans une cavité close et stérile et baigne dans un liquide viscoélastique sécrété par la membrane synoviale, le liquide synovial. Le cartilage articulaire permet de transmettre, d'amortir et de distribuer des charges tout en assurant un glissement harmonieux des pièces articulaires avec un coefficient de friction très bas. Sa capacité à subir des déformations réversibles est directement liée à son organisation structurale, c'est-à-dire à l'arrangement des macromolécules qui le composent.

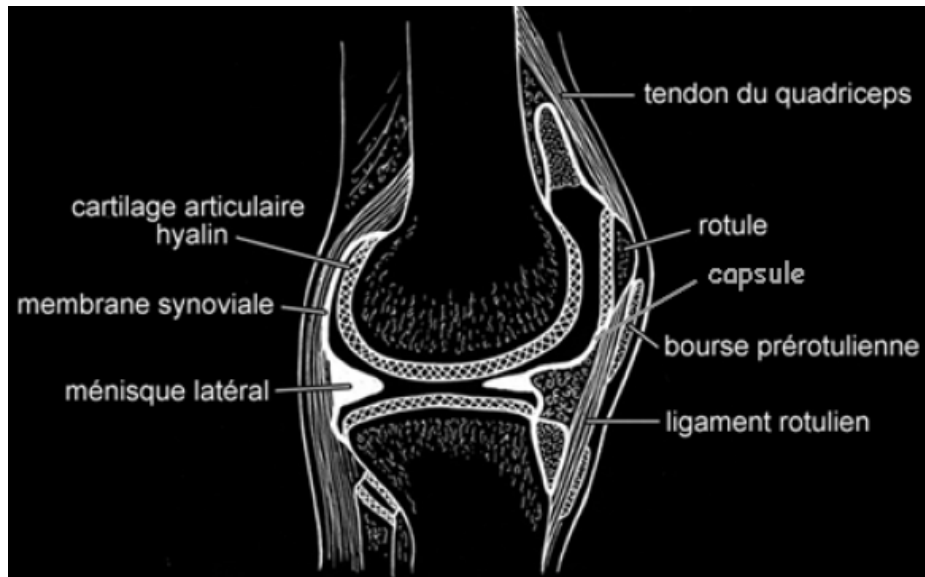


Figure 1 : Coupe sagittale d'une articulation du genou (Goldring, 2007).

1.1.2. Structure du cartilage hyalin

Le cartilage articulaire possède des propriétés essentielles qui permettent aux mouvements de se dérouler sans contrainte grâce à sa structure et à sa surface lisse ainsi qu'à la présence d'un film visqueux, le liquide synovial. Le cartilage articulaire joue également un rôle essentiel dans la répartition des contraintes mécaniques sur une surface maximale de l'os sous-chondral (Radin et Rose, 1986). Il est ainsi capable de résister aux forces de compression, tout en étant capable de se déformer pour supporter au mieux les contraintes mécaniques. Ces propriétés d'amortissement sont conférées par l'eau qu'il contient et qui constitue plus de 80% du poids du tissu hydraté, ainsi que par les protéoglycanes (PG) auxquels cette eau est associée et qui sont eux-mêmes piégés dans une trame de collagène.

Ainsi, il est essentiel que l'intégrité biochimique et structurale du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral soit conservée pour préserver la fonction articulaire. Les propriétés rhéologiques et de résistance à la pression du cartilage articulaire sont en effet directement liées à la présence de ses deux principaux constituants : les collagènes forment un véritable réseau nécessaire au maintien de l'aggrégat au sein de la Matrice Extracellulaire (MEC).

D'autres molécules protéiques participent à l'architecture du tissu en assurant des interactions entre les principaux constituants. Elles renforcent ainsi la structure, ou établissent des interactions entre la matrice et les chondrocytes (Buckwalter et Mankin, 1998).

1.1.3. Matrice extracellulaire (MEC)

La matrice extracellulaire est un ensemble complexe composé de protéines, d'eau et de petites molécules dissoutes (sucres, ions, oligopeptides). Elle remplit les espaces entre les cellules (espace extracellulaire) et possède plusieurs fonctions (Wang *et al.*, 2009) :

- elle aide à l'association des cellules pour former un tissu cohérent.
- elle contrôle la mobilité cellulaire.
- elle assure la résistance mécanique dans certains tissus comme les os, les parois des artères, les tendons et les ligaments.

Dans la matrice extracellulaire, elles existent quatre familles majeures de macromolécules : les collagènes, l'élastine, les protéoglycanes et les glycoprotéines de structure. L'aspect fibreux de la matrice est formé par le collagène et l'élastine. Les protéoglycanes et les glycoprotéines de structure comblent les interstices et les interfaces entre les cellules et la MEC (Labat-Robert *et al.* 1990 ; 2005).

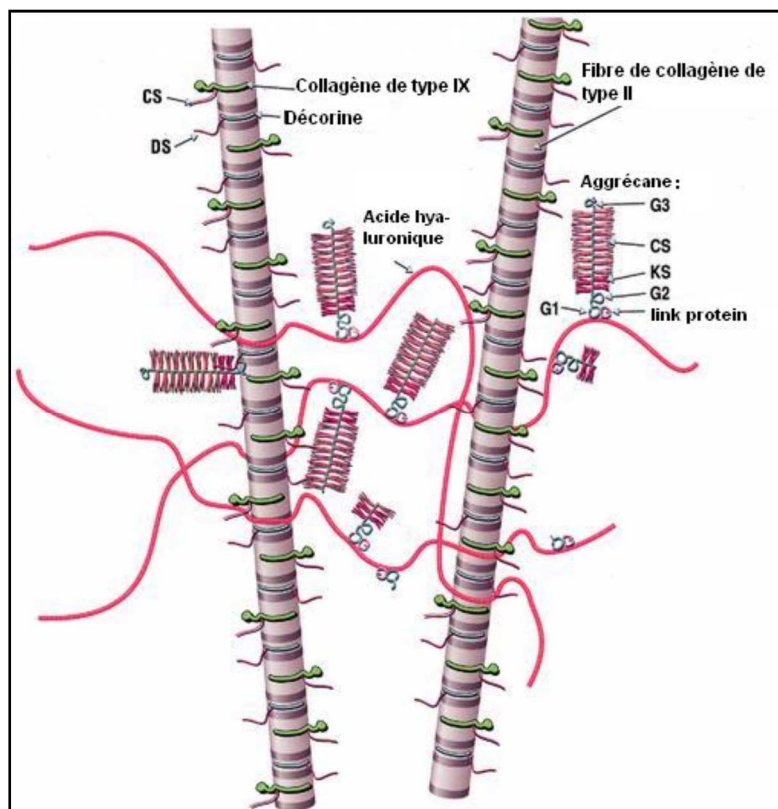


Figure 2 : Structure de la matrice cartilagineuse (Felson, 1998)

- **Protéoglycanes (PG) et glycoprotéines de structure (GPS)**

Les protéoglycanes sont des biomolécules ubiquitaires composées d'une protéine axiale et d'une ou de plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes sulfatés (GAG) attachées de façon covalente (Vignon, 2000). Au niveau du cartilage articulaire, elles se lient de façon non covalente à l'acide hyaluronique formant ainsi des agrégats dont les plus gros sont formés d'environ 300 molécules. L'aggrécane est le protéoglycane majeur du cartilage selon sa masse moléculaire. Il peut être répertorié en deux classes : aggrécane de haut poids moléculaire et aggrécane à faible poids moléculaire comme le biglycane et la fibromoduline (Buckwalter *et al.*, 1998).

Les glycoprotéines sont constituées aussi de complexes protéine-polysaccharide. Elles sont synthétisées par la glycosylation d'une protéine. Les glycoprotéines se distinguent des protéoglycanes par leur nature, la quantité et la disposition de leurs chaînes latérales de sucre (Fahem, 2007). Les glycoprotéines de structure sont particulièrement impliquées dans les phénomènes d'adhésion entre cellules et MEC. Selon Robert *et al.*, les glycoprotéines de structure sont des composants omniprésents dans la MEC et plusieurs d'entre eux comme la fibronectine ou la laminine jouent un rôle dans l'association des cellules aux macromolécules de la MEC tels que les collagènes, les protéoglycanes et l'élastine (Robert, 1986 ; Laurie *et al.* 1986 ; Aumailley *et al.* 2003).

- **Elastine**

L'élastine est synthétisée et sécrétée dans l'espace extracellulaire par les fibroblastes. L'élastine est le principal constituant des fibres élastiques. Elle est présente dans la plupart des tissus conjonctifs qui possèdent des propriétés d'élasticité remarquables. L'élastine possède une forte proportion de résidus apolaires, lui conférant son caractère hydrophobe. Cette hydrophobicité est un facteur déterminant des propriétés caoutchoutiques intensivement étudiées (Vrhovski *et al.* 1998).

- **Le collagène**

Le terme collagène est utilisé comme terme générique pour les protéines formant une triple hélice composée de trois chaînes associées de polypeptides (Van der Rest *et al.* 1990 ; Ricard-Blum *et al.* 2005). Plus d'une vingtaine de types de collagène est dénombrée à ce jour, qui sont classés en plusieurs sous familles déterminées en fonction de leur homologie de séquence, de leur similitude au niveau de l'architecture de chaîne et de leur assemblage. Dans la grande famille des collagènes, on distingue les collagènes fibrillaires, les collagènes associés aux fibrilles, les collagènes non fibrillaires et les collagènes transmembranaires.

La structure rigide du cartilage est conférée par le collagène fibrillaire, constitué principalement du ColIII et représentant 90-95% du collagène articulaire. Sa structure est d'une importance majeure dans la mesure où elle permet de maintenir aussi bien le volume que l'architecture tissulaire. D'autres types de collagène comme le collagène IX et XI sont également présents avec une proportion minime (Buckwalter *et al.*, 2005).

La synthèse et le renouvellement des composants de la MEC sont assurés par les chondrocytes qui à leur tour sont bordés par le collagène type VI leur permettant de s'adhérer à la MEC. Quant au collagène type X, il joue un rôle dans la minéralisation. Il entoure le chondrocyte au niveau de la zone du cartilage calcifiée et au niveau de la plaque de croissance (Buckwalter *et al.*, 2005).

D'autres types du collagène sont également présents au niveau de l'articulation constituant les autres structures articulaires tel que le ménisque composé principalement du collagène de type I avec le collagène III, V, VI et une contribution mineure du ColIII au niveau de cette structure (Bland, 1996).

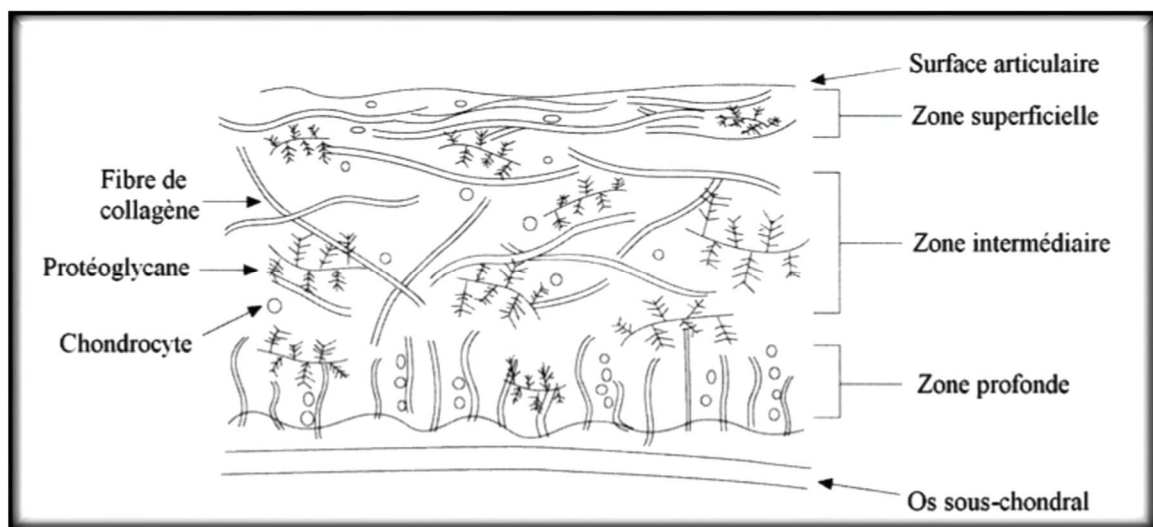


Figure 3 : Les composantes du cartilage articulaire (Setton *et al.*, 1999).

- **Les chondrocytes**

Les étapes de maturation suivant l'embryogénèse ont pour finalité la formation de deux populations chondrocytaires. L'une conduisant à la formation du cartilage articulaire et la deuxième subissant une maturation en chondrocytes hypertrophiques. Ils sont nommés en fonction de leur taille et en raison de l'expression de certaines molécules caractéristiques plus précisément le collagène type X, la phosphatase alcaline, l'ostéopontine et la MMP-13.

La vitesse de maturation des chondrocytes est sous le contrôle de facteurs qui peuvent soit l'accélérer ou la décélérer (Chun *et al.*, 2008).

Quant à la première population, elle est à l'origine des chondrocytes articulaires qui possèdent la capacité d'exprimer les constituants de la MEC comme le ColIII et l'aggrécane.

La chondrogenèse est régulée par des facteurs de croissance et de différenciation via la régulation des protéines kinases PKA et PKC (Woods *et al.*, 2007). La signalisation pour la régulation de la différenciation et de la prolifération chondrocytaires se fait via des intégrines et des récepteurs au collagène dont le discoidin domain-containing receptor 2 (DDR2) (Woods *et al.*, 2007). La taille, la forme et l'activité métabolique des chondrocytes articulaires varient dans les diverses couches du cartilage.

Ce type cellulaire est constitué de tous les organelles nécessaires pour la synthèse de la matrice sous l'effet de facteurs anaboliques, entre autres les protéoglycanes, l'aggrécane et le ColIII. Ces facteurs s'opposent aux facteurs cataboliques dont l'IL-1 β et les MMPs (Fortier *et al.*, 2011).

Après la maturation du squelette, les chondrocytes deviennent probablement incapables de se diviser et la synthèse de la matrice diminue aussi fortement. Mais malgré cela elle persiste. Contrairement aux croyances propagées, les chondrocytes ont une activité comparable à celle des autres cellules (Mankin, 1996). Bien qu'ils aient considérés comme des cellules quiescentes pendant longtemps. Ils ont la capacité d'assurer l'homéostasie cartilagineuse dans les conditions physiologiques. Cette homéostasie est assurée par de nombreux facteurs, contraintes mécaniques, facteurs de croissance ; Transforming Growth Factor (TGF), Fibroblast Growth Factor β (FGF β).

Avec l'âge, le nombre des chondrocytes diminue en raison de la mort cellulaire souvent accompagnée de changements morphologiques.

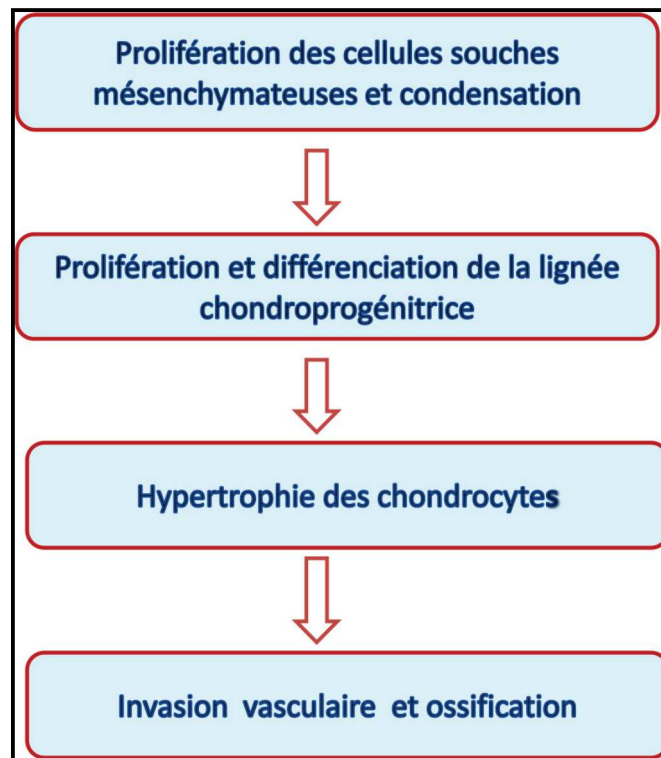


Figure 4 : Les principales étapes de l'évolution du cartilage articiel et de l'ossification enchondrale (Chun *et al.*, 2008).

1.2. Arthrose et anomalies des structures articulaires

Les changements physiopathologiques sont attribués à un réseau complexe formé de facteurs biochimiques qui engendrent une perturbation de l'équilibre entre la réparation et la dégradation tissulaire (Myers *et al.*, 1990 ; Fernandes *et al.*, 2002).

Ces changements incluent la dégradation protéolytique graduelle de la matrice du cartilage associée à une augmentation de la synthèse de ses composantes par les chondrocytes (Dieppe et Lohmander, 2005). Ces événements ont pour conséquence l'apparition de changements morphologiques au niveau du cartilage qui ont des répercussions sur d'autres tissus articulaires.

Alors que le liquide de l'œdème se résorbe, la quantité de protéoglycanes augmente. L'inflammation de la membrane synoviale contribue à la dérégulation de la fonction des chondrocytes du cartilage par la production de cellules pro-inflammatoires et des protéases (Goldring et Goldring, 2007). Ce phénomène provoque un épanchement intra-articulaire portant la dénomination d'arthrose qui modifie l'aspect visuel de l'articulation (Laadhar *et al.*, 2007).

1.2.1. Définition

Pour l'organisation mondiale de la santé (OMS), «l'arthrose est une maladie plurifactorielle résultant des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral ».

1.2.2. Étiologie de l'arthrose

L'arthrose est une pathologie articulaire caractérisée par une dégénérescence progressive des tissus composant l'articulation. L'arthrose se manifeste par des changements morphologiques, biomécaniques, moléculaires et biochimiques au niveau des cellules et de la matrice extracellulaire (Sharma *et al.*, 2003). Lorsqu'un patient développe l'arthrose, il peut en souffrir pour le reste de ses jours, et généralement, la sévérité de la douleur et de l'inaptitude augmente (Buckwalter et Martin, 2006).

L'étiologie de l'arthrose reste jusqu'à présent toujours incertaine. La pathologie est diagnostiquée lorsqu'elle devient symptomatique. Ce qui se produit dans la majorité des cas lorsque les altérations au niveau des structures articulaires sont déjà bien avancées.

L'arthrose touche principalement les articulations qui supportent le poids corporel, c'est-à-dire la colonne vertébrale cervicale et lombosacrée, la hanche, le genou et la première articulation métatarso-phalangienne. Dans certains cas, elle affecte aussi des articulations qui sont grandement sollicitées telles que les articulations de la main (interphalangienne distale, interphalangienne proximale et carpo-métacarpienne du pouce) (Felson, 2003).

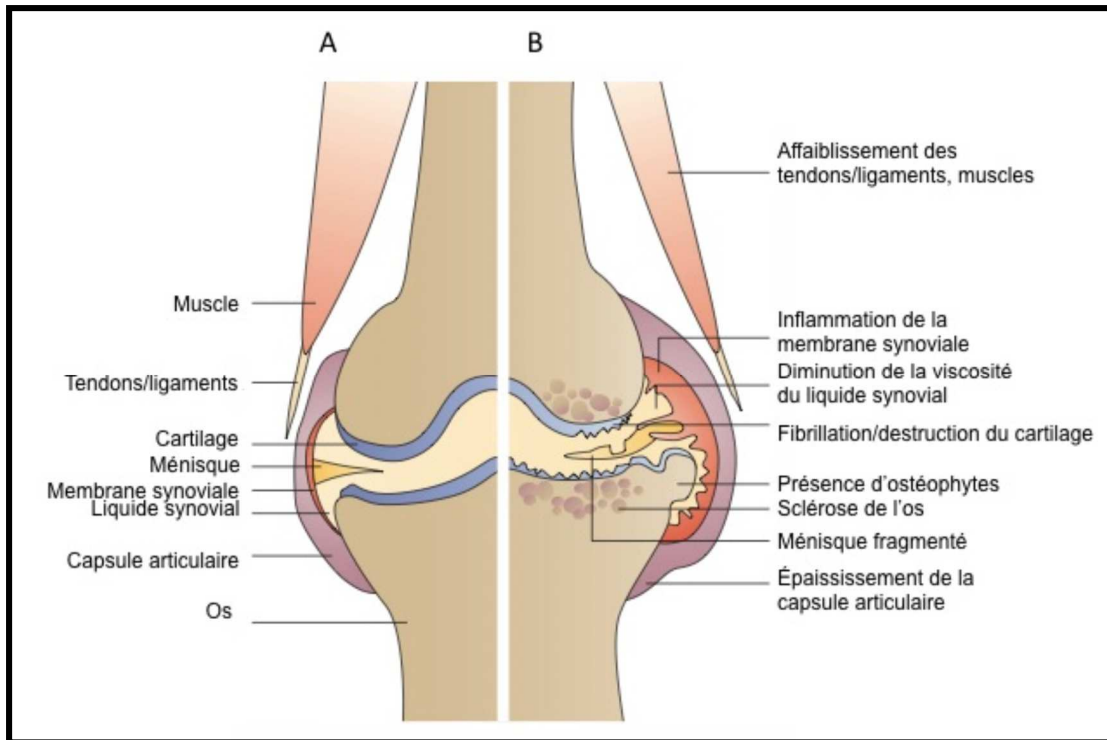


Figure 5 : Les structures articulaires impliquées lors de l'arthrose (Laadhar *et al.*, 2007).

1.2.3. Localisation de l'arthrose

Comme il a été précisé précédemment, l'arthrose est une maladie articulaire pouvant affecter n'importe quelle articulation du corps humain. Cependant, certaines articulations comme celles du genou et de la hanche sont plus vulnérables à la maladie comparativement à d'autres, à savoir celles de l'épaule, du coude et de la cheville qui sont moins souvent atteintes. Cette différence d'incidence a pour raison la différence de la charge pondérale portée pour chaque type d'articulation.

La colonne vertébrale à son tour peut également être touchée par l'arthrose. Cela conduit à une perte totale du mouvement aboutissant à l'incapacité physique (Martel-Pelletier, 2010).

1.2.4. Épidémiologie de l'arthrose

Des études épidémiologiques ont été réalisées pour décrire l'occurrence, la distribution de la maladie chez différentes populations ainsi que les facteurs de risque à l'origine de son apparition. Cependant, l'arthrose peut être définie d'un point de vue pathologique, radiologique ou encore clinique (Zhang et Jordan, 2008).

Toutefois, différentes études ont montré que la prévalence de l'arthrose varie selon plusieurs critères, entre autres la définition adaptée, l'articulation en question, ainsi que les caractéristiques de la population étudiée (Das, 2008). Une étude publiée par *Nevitt et al.*, a rapporté des signes radiographiques de l'arthrose survenant chez la majorité des personnes de 65 ans, et dans environ 80% chez les personnes âgées de plus de 75 ans (Arden et Nevitt, 2006). La prévalence de l'arthrose de la hanche est d'environ 9% chez la population blanche.

En revanche, des études réalisées sur d'autres populations indiquent sa très faible incidence estimée à 4% comparativement à la race caucasienne (Helmick *et al.*, 2008). Cette faible incidence peut être attribuée aux faibles taux d'anomalies congénitales ou développementales chez ces groupes. L'accroissement de l'incidence de l'arthrose chez certains groupes culturels est lié à l'adoption de certaines postures telles que l'accroupissement appliquant une forte pression sur la hanche (Zhang *et al.*, 2004).

1.2.5. Facteurs de risque

Les facteurs prédisposant à l'arthrose ont été divisés en deux grands groupes, les facteurs de risque systémiques et les facteurs de risque locaux.

1.2.5.1. Facteurs de risque systémiques

En sus de l'âge, le sexe, les hormones ainsi que d'autres facteurs prédisposent à l'arthrose.

- **Âge**

L'âge, représente le facteur de risque majeur lié à l'apparition de la maladie. Dans la plupart des études, la prévalence de l'arthrose augmente avec ce dernier quel que soit l'articulation (Davis *et al.*, 1991).

Ceci peut être expliqué d'une part par la diminution du nombre de chondrocytes à cause de la mort cellulaire, mais aussi par la diminution de leur capacité de produire et de répondre aux facteurs anaboliques (Zhang et Jordan, 2008).

L'augmentation de la fréquence de l'arthrose avec l'âge est une évidence confirmée par des données épidémiologiques (tableau 1). Chez l'adulte, elle est de 1 à 2,5 % pour l'arthrose de hanche, de 3 à 4 % pour l'arthrose de genou et devient 32 % pour l'arthrose des mains. Elle varie en fonction de l'âge : 15 % de sujets atteints entre 40 et 50 ans et 80 % au-delà de 70 ans.

Après 50 ans, l'arthrose est deux fois plus fréquente chez la femme que chez l'homme (Lawrence *et al.*, 2008).

Tableau 1 : Prévalence de l'arthrose en fonction de l'âge et de sexe (Lawrence *et al.*, 2008).

Age (ans)	Homme (%)	Femme (%)
<45	3	2
45-64	24,5	30
65-84	58	68
>84	85	85

- **Sexe et hormones**

Les femmes d'une manière générale sont plus susceptibles à développer l'arthrose comparativement aux hommes (Srikanth *et al.*, 2005). L'atteinte augmente chez elles après la ménopause (Zeng *et al.*, 2006).

Cependant, des études ont montré que la substitution hormonale est associée à une diminution de la prévalence de l'arthrose du genou et de la hanche, mais sans aucun effet protecteur notable (Nevitt *et al.*, 2002). Toutefois, l'administration des œstrogènes diminue le risque d'atteinte de l'arthrose de la hanche de 50% et de 30% les manifestations sévères (Hannan *et al.*, 1990).

Ces résultats ont été confirmés par une autre étude réalisée par Nevitt *et al.*, qui avait montré que les femmes ayant subi un traitement aux œstrogènes présenteraient une réduction de 15% dans le nombre de prothèses de remplacement de la hanche ou du genou comparativement aux femmes n'ayant reçu aucun traitement, et donc le rôle des œstrogènes dans l'arthrose reste encore controversé.

- **Facteurs géographiques et prédisposition génétique**

La prévalence de l'arthrose et l'articulation affectée varient d'une population à l'autre. Toutefois, l'arthrose de la hanche et de la main sont moins fréquentes chez la population chinoise comparativement à d'autres populations. Bien au contraire, l'arthrose du genou est plus fréquente chez cette population. Des différences raciales sont à l'origine de cette variation, notamment des différences anatomiques (Nevitt *et al.*, 2002).

En plus des différences géo-ethniques qui peuvent exister d'une population à l'autre, plusieurs évidences révèlent l'importance de facteurs génétiques dans l'arthrose (Hannan *et al.*, 1990). À titre d'exemple, une partie du facteur de différenciation de croissance 5 (GDF5) est associée à la susceptibilité de l'arthrose chez certaines populations comme la population chinoise (Miyamoto *et al.*, 2007). Il existe toutefois une association entre le polymorphisme de ce gène et l'apparition de la maladie à travers le monde.

- **Régime alimentaire**

Une relation étroite pourrait exister entre l'alimentation et l'incidence ou encore la progression de l'arthrose. Une étude réalisée par Wluka *et al.*, (2004) avait montré que la progression de l'arthrose symptomatique et radiologique du genou était associée à un faible apport en vitamine C. Toutefois, une relation inverse existerait entre l'apport en vitamine E et la progression de l'arthrose.

De plus, un essai clinique a montré qu'un apport contrôlé en vitamine E n'a pas eu d'effet sur la progression de l'arthrose du genou tel que mesuré par le volume du cartilage à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). De plus, une autre étude réalisée par Neogi et Scholz, (2009) a montré que des niveaux élevés en vitamine K étaient associés à une faible prévalence de l'arthrose radiologique de la main.

1.2.5.2. Facteurs de risques locaux

- **Obésité et activité professionnelle**

L'obésité est considérée comme un facteur de risque, plus particulièrement à l'arthrose du genou (Javier *et al.*, 2011). Sa relation avec l'arthrose de la hanche n'est toujours pas évidente mais si cette dernière existait son impact serait sans doute inférieur à celui de l'arthrose du genou.

L'augmentation de la charge sur l'articulation en raison d'une forte masse corporelle est probablement le mécanisme principal par lequel l'obésité est à l'origine de l'arthrose du genou : par l'induction de la dégradation du cartilage articulaire et par l'atteinte des structures ligamentaires et des autres composantes de l'articulation (Zhang et Jordan, 2008). Toutefois, la charge pondérale ne semble pas être le seul mécanisme responsable de l'apparition de l'arthrose chez les personnes obèses dans la mesure où une augmentation de l'arthrose de la main est notée également chez ces personnes. Chez ces personnes, le tissu adipeux blanc est responsable de la production de nombreux médiateurs inflammatoires dont l'IL-1 β , l'IL-6, TNF- α .

Ils s'ajoutent à ces médiateurs les adipokines connus pour leurs effets pléiotropiques et qui sont impliqués dans un large éventail d'activités notamment dans le métabolisme des lipides et la modulation de l'inflammation. Parmi ces adipokines, on retrouve la leptine (Koskinen *et al.*, 2011).

La leptine est une hormone ayant un rôle anabolique au niveau du cartilage. Paradoxalement, il a été démontré dans les travaux réalisés par Toussirot *et al.* (2007) que cette hormone possède un rôle dans la physiopathologie de l'arthrose par l'induction de la production des MMPs, dont la MMP-9 et la MMP-13 (Toussirot *et al.*, 2007). Cependant, elle peut agir en synergie avec l'IL-1 β en induisant la production de MMP-1 et MMP-3 (Koskinen *et al.*, 2011).

Le niveau d'expression de la leptine et de son récepteur est augmenté au niveau du cartilage arthrosique, ainsi qu'au niveau du liquide synovial au stade avancé de la maladie. Ku *et al.*, (2009) ont montré qu'il existe une relation entre la concentration en leptine au niveau du liquide synovial et la sévérité radiologique de l'arthrose, ce qui confirme son implication dans la physiopathologie de l'arthrose. L'ensemble de ces données peuvent nous mener à penser que les adipokines d'une manière générale et la leptine plus spécifiquement peut être le lien entre l'obésité et l'arthrose.

- **Facteurs mécaniques et alignement**

Pendant longtemps, il a été suggéré que la faiblesse et l'atrophie musculaire observées lors de l'arthrose du genou étaient la conséquence de la douleur. Or, au fil du temps il s'est avéré que les personnes présentant une arthrose radiologique asymptomatique présentaient également ces symptômes. Ces résultats sont confirmés par une étude réalisée par Zhang *et al.*, (2008) qui a montré que la faiblesse des quadriceps n'est pas uniquement la conséquence de la douleur reliée à l'arthrose, mais plutôt constitue en elle-même un facteur de risque pour des dommages structuraux de l'articulation.

L'alignement du genou constitue à son tour un facteur de risque pour l'arthrose. On définit par l'alignement du genou « l'angle de la hanche-genou-cheville qui est un déterminant clé de l'application de la charge sur l'articulation telle qu'elle soit la hanche, le genou, ou encore la cheville. Ce qui laisse supposer que les genoux mal alignés contribuent au développement et à la progression de l'arthrose (Hunter *et al.*, 2007).

- **Laxité et contribution du ménisque**

La laxité du genou peut être considérée comme un facteur de risque. Cependant, une étude transversale a montré que la laxité du genou est plus importante chez les patients non arthritiques et ayant une maladie idiopathique que dans les genoux contrôles. Ce qui laisse supposer que la laxité du genou pourrait précéder l'apparition de l'arthrose et par conséquent, représenter un facteur de risque (Sharma *et al.*, 1999). Des études réalisées par Biswal *et al.*, (2002) et Berthiaume *et al.*, (2005) ont montré qu'il existe une association entre la position du ménisque, la présence de dommages à son niveau et la perte cartilagineuse.

L'ensemble de ces données indiquent que l'arthrose est une maladie multifactorielle. Elle dépend aussi bien de facteurs intrinsèques liés à l'individu lui-même comme la génétique, la laxité ligamentaire, la position du ménisque ou encore des facteurs extrinsèques comme le régime alimentaire ou l'activité professionnelle.

1.3. Diagnostic de l'arthrose

Le diagnostic de l'arthrose peut être défini selon des critères symptomatiques (ou cliniques), des critères radiologiques ou la combinaison des deux (Arden et Nevitt, 2006). Les critères symptomatiques se résument par la présence d'une douleur articulaire persistante (ressentie tous les jours sur une période d'un mois) et, dans certains cas, de la raideur articulaire matinale (durée < 30 minutes) ou des crépitements lors du mouvement. Cela dépend, entre autres, des articulations atteintes. Les critères radiologiques sont basés sur les signes témoignant de dégénérescence articulaire tels que l'observation d'une diminution de l'espace articulaire (associée à une perte de cartilage) et d'une hypertrophie de l'os sous-chondral (augmentation de sa densité et le développement d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux) (The Bone and Joint Decade, 2005).

Cette pluralité de critères ou de définitions dans le diagnostic de la maladie est due au fait que l'arthrose peut être silencieuse et qu'il n'existe pas une très forte corrélation entre les signes radiologiques et les symptômes ainsi que les incapacités qui peuvent en découler (Sharma *et al.*, 2006). À cet effet, chez certaines personnes, on peut observer une importante dégénérescence articulaire et très peu de douleur ou de perte de fonction motrice (arthrose radiologique asymptomatique). Alors que chez d'autres individus, on retrouve les symptômes typiques de l'arthrose mais aucune confirmation radiologique de la pathologie (arthrose symptomatique seulement) tel que mentionné par Buckwalter et Martin (2006). Le Comité de Taxinomie de

l'Association Internationale pour l'Etude de la douleur (International Association for the Study of Pain – I.A.S.P.-) défini la douleur comme « *une sensation désagréable et une expérience émotionnelle en réponse à une atteinte tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite en ces termes* » (Merskey et Bogduk, 1994).

Selon Lamont *et al.* (2000), la douleur arthrosique est une douleur pathologique, chronique, discrète à sévère. C'est pour cette raison que l'on parle d'affection débilite. La douleur n'est pas seulement longue dans le temps, elle détériore aussi considérablement la qualité de vie.

➤ Examen clinique

Au stade tardif de l'arthrose, il y a un épaississement de la capsule articulaire qui devient ferme et fibreuse. Les troubles fonctionnels font partie de l'ensemble des manifestations orthopédiques de l'expression clinique arthrosique et varient en fonction de la localisation de l'articulation atteinte (Maitre *et al.*, 2007).

A l'examen de la mobilité, il peut également y avoir des bruits articulaires tels que frottement, grincement et craquement. Il peut également y avoir des phénomènes de blocage, suite à des problèmes de glissement des surfaces articulaires ou à des relâchements de l'appareil capsulo-ligamentaire avec instabilités.

En 1985, Morton et Griffiths publient pour la première fois un article sur les modifications comportementales observées chez des animaux de laboratoire soumis à des douleurs aiguës et chroniques. Les comportements observés sont les suivants : agressivité, soumission, crainte, agitation, léthargie, changements dans l'activité locomotrice, curiosité, vocalisations, automutilation, modifications d'appétit, de prise de boisson et du comportement social.

➤ Examen radiologique

Les méthodes d'imagerie radiologique comprennent la radiographie par rayon X, la scintigraphie radio-isotopique, la tomographie assistée par ordinateur (scanner), l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'ultrasonographie. Les appareils à rayon X sont très répandus (McIlwraith, 2002). La radiographie est l'examen complémentaire le plus utilisé en médecine équine pour le diagnostic de l'arthrose. C'est un examen qui nécessite une codification afin d'obtenir des images comparables et interprétables (Denoix, 2002 ; Peterfy, 2002).

L'examen des clichés radiographiques sera centré sur la recherche de signes directs mais aussi des facteurs prédisposants. On s'intéressera donc en particulier à :

- **La recherche de distension articulaire** : les tissus mous peuvent paraître épaissis en regard des récessus articulaires. Cette impression doit toujours être confrontée à la clinique.
- **La recherche de remaniements articulaires et périarticulaires** : Les remaniements du périoste se présentent comme des irrégularités de la surface osseuse extra-articulaire, là où il devrait être lisse.
- **L'espace interarticulaire** : on cherche de l'amincissement de la zone radio-transparente entre les surfaces articulaires en cas de dégénérescence cartilagineuse.
- **L'os sous-chondral** : on cherche des signes de sclérose sous-chondrale, c'est-à-dire un épaississement et une augmentation de la densité radiographique de l'os sous-chondral.

Dans la phase aigüe d'une lésion du squelette ou des tissus mous, diverses méthodes d'imagerie peuvent fournir de précieuses informations complémentaires. Au stade initial, il n'y a souvent rien d'anormal sur les radiographies. Les signes radiologiques d'une arthrose débutante sont une sclérose sous-chondrale au niveau des surfaces les plus sollicitées de l'articulation. Ce n'est qu'à un stade plus avancé qu'apparaissent les signes typiques d'arthrose avec pincement de la fente articulaire et lésions osseuses kystiques sous-chondrales avec ostéophytes périarticulaires (Denoix, 2002 ; Peterfy, 2002).

Ces lésions radiologiques classiques ont été classées en 4 stades par le radiologue britannique Kellgren et Lawrence (1957) (I = douteuse, II = discrète, III = modérée, IV = sévère). Cette classification s'est imposée comme critère radiologique simple de la gravité d'une arthrose, aussi bien en pratique que dans les études cliniques pharmacologiques sur l'arthrose. Mais il existe des classifications radiologiques plus récentes, basées sur un atlas comparatif radiologique validé publié par l'«International Osteoarthritis Research Society».

Au cours de ces dernières années, l'ultrasonographie de l'appareil locomoteur s'est bien installée dans le diagnostic musculosquelettique et périarticulaire. Elle permet à l'examineur exercé de visualiser non seulement les synovites et arthrites intra-articulaires, mais aussi les structures périarticulaires, bursites et tendinopathies, pour pouvoir les traiter de manière plus ciblée (Gerber *et al.*, 2000). La tomographie par résonance magnétique (IRM) permet de visualiser particulièrement bien les ménisques, les ligaments et le cartilage articulaire. Mais cet examen cher ne doit être demandé que spécifiquement, p.ex. pour exclure une lésion méniscale cliniquement suspecte (Vandeberg *et al.*, 2001).

Actuellement, il n'existe pas de moyens permettant le dépistage précoce de la maladie. Pourtant, celui-ci permettrait l'administration d'une thérapie (médicamenteuse et/ou physique) au début de la maladie, avant que les lésions ne deviennent irréversibles. Un autre moyen est de doser dans le sang ou l'urine une ou plusieurs substances qui signent la présence de la maladie. Ces substances sont appelées « marqueurs biologiques ».

1.4. Biomarqueurs de l'arthrose

L'étude de marqueurs biologiques, ou biomarqueurs, a connu un progrès énorme lors des dernières années. Un biomarqueur est défini comme un indicateur d'un état physiopathologique et peut être mesuré et évalué de façon objective (Poole *et al.*, 2010).

Ces biomarqueurs peuvent être une réponse physiologique telle qu'une accentuation de la fréquence cardiaque ou une diminution de la consommation d'oxygène, mais ils peuvent aussi être moléculaires (enzymes, macromolécules, protéines, neuropeptides) (Ritsner et Gottesman, 2009). Ces molécules peuvent se retrouver à l'intérieur des tissus ou des fluides biologiques (liquide synovial, sérum, sang, urine, liquide céphalorachidien) et sont utilisées dans divers champs d'études scientifiques. Dépendamment de l'application, ces biomarqueurs peuvent être utilisés pour l'évaluation des risques de développer un état pathologique, pour l'indentification d'une pathologie ou de son stade de progression, ou encore pour prédire une réponse à un traitement. Un biomarqueur doit donc refléter le processus physiopathologique, être spécifique, doit se mesurer de façon répétée et doit être reproductible (Ritsner et Gottesman, 2009).

L'imagerie standard reste incomplète, grossière et peu sensible au changement. L'IRM reste un examen relativement lourd et onéreux. D'où la recherche de marqueurs biologiques de l'arthrose qui seraient plus sensibles au changement arthrosique de l'articulation (intérêt diagnostique), plus sensibles aux variations structurelles de la maladie (intérêt pronostique), tout en étant de réalisation simple (Syversen *et al.*, 2009).

La recherche d'un marqueur unique paraît illusoire et c'est probablement l'étude de plusieurs marqueurs qui permettra de progresser : marqueurs des différents tissus de l'articulation, marqueurs de la synthèse et de la dégradation des constituants de ces différents tissus (tableau 2).

Tableau 2 : Quelques marqueurs potentiels de l'arthrose (Syversen *et al.*, 2009).

	Marqueurs de synthèse	Marqueurs de dégradation
Os	<ul style="list-style-type: none"> - Ostéocalcine - Phosphatases alcalines osseuses - Fractions N et C terminales du propéptide du collagène de type 1 	<ul style="list-style-type: none"> - (deoxy) pyridinoline - Fractions N et C terminales du télopéptide du collagène de type 1 (NTXI, CTX-I)
Cartilage	<ul style="list-style-type: none"> - Fractions N et C terminales du propéptide du collagène de type 2 - Chondroïtine sulfatée (épitopes 846, 3B3, 7D4) - YKL-40 	<ul style="list-style-type: none"> - Fraction C terminale du télopéptide du collagène de type 2 (CTX-II) - Keratane Sulfate (épitopes 5D4, ANP9) - Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)
Synoviale	<ul style="list-style-type: none"> - Acide hyaluronique - YKL-40 - COMP 	<ul style="list-style-type: none"> - Matrix metalloproteinases (MMPs) - Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)
Inflammation	CRP	

❖ L'interleukine-6

L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine pro-inflammatoire pléiotrope produite par de nombreux types cellulaires. Elle participe à des processus physiologiques tels que l'activation des lymphocytes T, l'induction de la sécrétion d'immunoglobulines, l'induction de la synthèse des protéines hépatiques de la phase aiguë de l'inflammation, et la stimulation de l'hématopoïèse. Elle est mise en cause dans la pathogenèse de différentes affections, dont la polyarthrite rhumatoïde (PR) et l'arthrose (Fonseca, 2009).

Cette cytokine IL-6, polypeptide de 21 KDa, comporte 212 acides aminés constituant 4 chaînes alpha. Son gène est sur le chromosome 7p21. Sa production déclenchée par différents stimulus, en particulier l'IL-1 β , le TNF- α , l'interféron γ est assurée par les monocytes activés, les macrophages, les lymphocytes T et B, les fibroblastes.

- ❖ **L'acide hyaluronique** : il reflète plus l'activité de synthèse de la membrane synoviale. Il est corrélé avec l'évolution de la gonarthrose et de la coxarthrose.
- ❖ **Le TNF- α** : il occupe une place importante en physiologie, et il est un acteur décisif de l'immunité innée, comme molécule antitumorale et anti-infectieuse, notamment mais pas seulement en tant que molécule armant le macrophage (Tracey *et al.*, 2008).
- ❖ **La partie C terminale du collagène de type 2 (CTX-II)** : elle s'est révélée être prédictif de l'évolution de la coxarthrose et de la gonarthrose. HELIX et PIIANP sont des fragments de dégradation du collagène type II qui ont été récemment isolés et utilisés comme biomarqueurs pronostiques de l'arthrose.
- ❖ **Le COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein)** : c'est une glycoprotéine spécifique du cartilage et prédictive, mais pas corrélée, aux poussées.
- ❖ **La CRP ultrasensible** : la composante inflammatoire de l'arthrose est "détectable" en périphérie par ce dosage. Le taux de CRP est élevé au cours des chondrolyses rapides et serait également prédictif de l'évolution de la gonarthrose.
- ❖ **Pyridinoline (PYD) et Déoxy-Pyridinoline (DPYD)**

PYD et DPYD sont des molécules trivalentes liées aux télopeptides C- et N-terminaux de la molécule de collagène I. Ces molécules de pontage sont toutes deux présentes dans la matrice osseuse où PYD est en quantité trois fois plus importante que DPYD. PYD est présente aussi dans le cartilage mais aussi dans les vaisseaux sanguins, les intestins, le muscle. DPYD est plus spécifique de l'os où elle se trouve en quantité significative. Après la destruction du collagène osseux par les ostéoclastes, PYD et DPYD sont libérées dans la circulation et éliminées dans les urines sous forme libre (40 %) et liée à des restes peptidiques des télopeptides (60 %). PYD et DPYD peuvent être dosées sous leur forme libre dans les urines ou dans le sérum par des méthodes immunologiques (ELISA). DPYD a été l'objet de nombreuses études et s'est révélée être un marqueur de résorption osseuse sensible (Christenson, 1997).

Facteurs de variations physiologiques

Plusieurs de ces marqueurs varient en fonction de l'âge, du sexe, de l'indice de masse corporelle, de l'heure du recueil (rythme circadien), de l'effort physique. Autant de facteurs confondants à prendre en compte dans l'interprétation des résultats.

Ces marqueurs biologiques sont identifiés dans le sang de patients arthrosiques dont la présence ou la modification de leurs concentrations révélerait l'arthrose. A cette fin, des méthodes permettent de séparer ces composants dans le sang, de comparer la composition d'échantillons normaux et pathologiques, d'identifier la maladie, de les quantifier et enfin, de les isoler. Ensuite, des dosages permettant de mesurer la concentration de ces marqueurs dans le sang seront développés. Et donc, l'arthrose pourra bientôt être diagnostiquée par une simple prise de sang.

1.5. Prise en charge thérapeutique de l'arthrose

Le développement d'un traitement doit prendre en considération que les signes et les symptômes varient selon l'articulation atteinte et selon le stade de progression de la pathologie (Lozada et Altman, 2005). Lorsque la pathologie est déjà présente, les thérapies sont dirigées vers les symptômes tels que la douleur, l'instabilité et la faiblesse articulaire et la diminution de la fonction de l'articulation. Toutefois, le programme d'intervention le plus efficace reste toujours la prévention. Dans un premier temps, il sera conseillé aux patients obèses une perte de poids afin de diminuer la charge sur l'articulation lésée (Minor, 2004). Un programme d'exercice peut être prescrit afin de renforcer la musculature qui supporte l'articulation (Thomas *et al.*, 2002). Il a été démontré que des programmes d'exercice peuvent réduire la douleur et améliorer la fonction de l'articulation (Fisher *et al.*, 1991). De plus, il n'y a aucun avantage à immobiliser une articulation lors de douleur chronique (Waddell, 1987). Des accessoires de support tels que la canne, la marchette ou les béquilles à appui anti-brachial, peuvent aussi être prescrits. Ces accessoires permettent d'alléger le support de la charge par l'articulation, d'agrandir la base de support et d'améliorer certains symptômes comme la perte d'équilibre et la douleur.

Un lavage arthroscopique par injection intra-articulaire d'eau saline a démontré une efficacité chez certains patients pour le soulagement de la douleur (Livesley *et al.*, 1991), mais son utilisation reste controversée (Gibson *et al.*, 1992). Lorsque la qualité de vie est grandement réduite et qu'aucune solution ne permet de réduire la perception de la douleur, l'approche chirurgicale peut être prescrite comme option de dernier recours.

La raison principale d'exécution d'une chirurgie orthopédique est la douleur intolérable continue (Lozada et Altman, 2005). Ces interventions incluent entre autres le débridement de tissus libres retrouvés dans l'articulation (arthroscopie), une redistribution des forces dans l'articulation (ostéotomie) et le remplacement de structures articulaires (arthroplastie).

Les interventions pharmacologiques ont des effets grandement appréciés par la population atteinte d'arthrose. Elles se divisent en deux classes distinctes selon leurs objectifs ; celles qui modifient les symptômes associés à la pathologie (symptom modifying osteoarthritis drugs, SMOADs) et celles qui modifient la pathologie (disease modifying osteoarthritis drugs, DMOADs). La raison principale d'un traitement pharmacologique chez les sujets atteints d'arthrose reste toujours jusqu'à ce jour la recherche d'une analgésie locale afin de diminuer et de contrôler la douleur accompagnée de moins d'effets secondaires possibles (Bradley, 2004).

❖ Agents analgésiques

1. Acétaminophène

Le premier choix de traitement pharmacologique recommandé par le Collège des rhumatologues américains est l'acétaminophène (paracétamol, Tylenol®). Son efficacité a été démontrée, tout comme l'absence de contre-indications et d'interactions médicamenteuses ainsi que la sécurité qui y est associée pour un traitement à long terme. L'avantage de cet agent est son coût minime et sa disponibilité en vente libre.

L'acétaminophène pénètre rapidement le SNC et ses actions se font par l'entremise de l'activation de la voie sérotoninergique du contrôle inhibiteur de la douleur (Tjolsen *et al.*, 1991). Il est aussi rapporté que ces effets analgésiques centraux impliquent les voies opioïdes endogènes (Raffa *et al.*, 2000). Tout comme l'aspirine, l'acétaminophène démontre une courbe dose-réponse linéaire qui atteint un plateau vers les 1000 mg (Cooper, 1981). Chez l'humain, la dose maximale recommandée est de 4000 mg/jour pris en plusieurs petites doses. L'acétaminophène est suggérée être un traitement efficace pour une sévérité de la douleur articulaire faible à modérée, mais a aussi démontré une efficacité chez des patients atteints d'arthrose du genou accompagnée de douleur modérée à sévère (Bradley *et al.*, 2001). Il reste néanmoins une controverse entourant ce traitement pharmacologique pour l'arthrose. Des études épidémiologiques ont rapporté que la prise d'acétaminophène chronique pouvait engendrer une insuffisance rénale aiguë, et qu'une surdose initierait une nécrose hépatique (Bradley, 2004 ; Lozada et Altman, 2005).

2. Opiïdes

Les opioïdes sont rapportés comme des agents agissant sur le SNC et le SNP. Une injection intra-articulaire à faible dose de morphine a démontré une efficacité dans la réduction de la douleur (Stein *et al.*, 1991). Les mécanismes centraux prédominent lorsque des opioïdes exogènes sont administrés de façon systémique dus à la grande densité de récepteurs opioïdes dans le SNC et de la perméabilité de celui-ci aux opioïdes exogènes (Bradley, 2004).

Contrairement aux AINS, les opioïdes exogènes sont actifs en présence ou non de l'inflammation (Chauvin et Beaulieu, 2005). Les opioïdes les plus prescrits pour la douleur reliée à l'arthrose sont le tramadol, le proxypène, la codéine et l'oxycodone. Les opioïdes peuvent déprimer le système respiratoire, induire une bronchoconstriction, ralentir la motilité gastro-intestinale, provoquer des nausées et vomissements et avoir des effets indésirables au niveau des systèmes cardiovasculaire, urinaire et oculaire (Chauvin et Beaulieu, 2005). La prise répétée d'opioïdes peut engendrer une dépendance physiologique et/ou psychologique au médicament.

❖ Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les AINS sont les analgésiques les plus communs pour traiter la douleur reliée à l'arthrose. Ils ont démontré une efficacité supérieure à l'acétaminophène pour le soulagement de la douleur modérée à sévère chez des patients atteints d'arthrose du genou (Pincus *et al.*, 2001).

Ils agissent principalement en périphérie mais ont des effets substantiels au niveau de la moelle épinière et du cerveau dépendamment de leur lipophilicité (Bradley, 2004). Le mécanisme d'action le plus rapporté des AINS est la capacité d'inhiber l'enzyme COX et ainsi réduire la douleur en éliminant la production de PGs par son action oxydative de l'acide arachidonique. Les AINS classiques sont de petites molécules hydrophobes qui ont une configuration structurale leur permettant une pénétration non spécifique dans le canal hydrophobe de la COX-1 et la COX-2 (Fletcher, 2005).

Ils inhibent la synthèse des PGs en bloquant de façon non sélective l'isoforme constitutive de la COX exprimée (COX-1) et l'isoforme induite (COX-2), ou de façon sélective la COX-2 (Neogi et Scholz, 2009).

Lors de douleur inflammatoire, les AINS jouent un rôle significatif dans la diminution de la vasodilatation, de l'œdème et de la douleur (Rang *et al.*, 2007). Parmi les AINS classiques, qui ne sont pas sélectifs à la COX-2, sont l'aspirine (acide salicylique), le diclofénac (Arthrotec®), l'ibuprofène (Advil® et Motrin®).

Certains sont des agents peu dispendieux et disponibles en vente libre, mais des effets secondaires associés à une prise continue de ces traitements sont grandement rapportés (Bradley, 2004). Des symptômes gastro-intestinaux tels que des ulcères et des saignements dus au rôle important des PGs dans la protection cytogastrique et dans l'agrégation plaquettaire ont été rapportés (Rang *et al.*, 2007). Chez certains patients, ce traitement peut aussi causer une insuffisance rénale par l'inhibition de la biosynthèse des PGs impliquées dans le maintien de la circulation sanguine rénale (Rang *et al.*, 2007).

De nouveaux COXs ont récemment été développés et possèdent une double action inhibitrice, soit par l'inhibition de la lipoxigénase (agents appelés COX-LOX) ou encore des agents couplés des groupements donneurs de NO (Neogi et Scholz, 2009).

Ces agents sont principalement des anti-inflammatoires avec une sécurité gastro-intestinale améliorée, mais sont toujours associés à un risque accru d'ischémie du myocarde (Antman *et al.*, 2007; Wieland *et al.*, 2005). La majorité des patients atteints d'arthrose sont âgés et sont souvent plus à risque de développer des maladies cardiovasculaires. Cela rend le choix des AINS inhibiteurs du COX-2 peu approprié pour un traitement à long terme chez ce groupe de patients. De façon globale, les AINS sont administrés oralement mais aussi de façon topique, intra-articulaire ou intraveineuse. Les AINS ont de longs délais d'action, quelle que soit la voie d'administration (Fletcher, 2005).

1.6. Traitements naturels

Plusieurs extraits de dérivés de plantes sont reconnus pour leurs propriétés thérapeutiques. Ils offrent une alternative potentiellement plus sécuritaire et moins onéreuse aux traitements pharmacologiques conventionnels. Certains dérivés sont reconnus pour leur efficacité dans le traitement de la douleur reliée à l'arthrose. Parmi ceux-ci :

- **La capsaïcine** : c'est la plus rapportée et est administrée par application topique (Towheed et Hochberg, 1997). La capsaïcine est un dérivé alcaloïde de la plante *Capsicum* et est l'ingrédient actif du piment fort. La capsaïcine est utilisée pour le traitement de la douleur neuropathique engendrée par diverses conditions telles que le diabète et les névralgies faciales et postherpétiques (Rains et Bryson, 1995).
- **La curcumine** : c'est le principal constituant de la plante *Curcuma longa*. Elle est couramment utilisée comme épice culinaire et est largement documentée pour ses propriétés médicinales (Singh, 2007). Ses propriétés pharmacologiques sont attribuées à ses effets antioxydants et anti-inflammatoires (Sandur *et al.*, 2007).

Son activité anti-inflammatoire est rapportée *in vitro* par sa capacité d'inhibition de la transcription génique dépendante de l'expression des IL-1 β , IL-6 et IL-8 et des PGE2 dans les chondrocytes bovins et humains (Shakibaei *et al.*, 2007).

L'efficacité clinique du Meriva®, un composé pharmacologique à base du complexe phytosomique de curcuma-phosphatidylcholine a récemment démontrée une amélioration de la fonction articulaire et une diminution de douleur articulaire perçue chez des patients atteints d'arthrose du genou suite à une administration quotidienne pour une durée de trois mois (Belcaro *et al.*, 2010).

Il a été démontré qu'une administration orale de gingembre peut être utilisée à des fins thérapeutiques pour l'arthrose. Des études cliniques randomisées et contrôlées ont démontré une réduction significative des symptômes de la pathologie telle que la douleur au genou (Altman et Marcussen, 2001). Par contre, la forte dose orale de gingembre requise pour atteindre une réponse efficace au traitement a souvent induit des malaises gastro-intestinaux (Marcus et Suarez-Almazor, 2001). Pour leur part, les effets topiques du gingembre par l'application de compresses ont démontré une meilleure mobilité de l'articulation et une diminution de la douleur (Therkleson, 2010). Les propriétés anti-inflammatoires reconnues du gingembre telles que l'inhibition de la COX-1 et COX-2 ainsi que la suppression de la synthèse des leucotriènes peuvent être impliquées (Grzanna *et al.*, 2005).

CHAPITRE II.

**LES PLANTES MEDICINALES ET
LES VERTUS DE
L'AROMATHERAPIE**

L'homme utilise plusieurs plantes trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner plusieurs maladies. Ces plantes représentent un réservoir immense de composés de structure chimique diverse. Ils possèdent un très large éventail d'activités thérapeutiques dont l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

2.1. Plantes médicinales

2.1.1. Définition

D'après la X^{ème} édition de la Pharmacopée française, les plantes médicinales sont « *des drogues végétales au sens de la Pharmacopée européenne dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses* ». Ces plantes médicinales peuvent également avoir des usages alimentaires, condimentaires ou hygiéniques.

Pourtant en France, une définition officielle est donnée par la jurisprudence : "*une plante est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal, c'est-à-dire que les plantes sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales. Dans le seul cas où ces deux conditions sont réunies, alors la plante appartient à l'usage pharmaceutique. Elles sont considérées comme des médicaments et leur vente est exclusivement réservée aux pharmaciens*".

La plante, organisme vivant, marque son identité par des spécificités morphologiques à l'origine de la classification botanique, mais aussi biochimique, liées à des voies de biosynthèses inédites représentant l'intérêt de l'usage des plantes médicinales (Bruneton, 1987).

2.1.2. Éléments actifs des plantes médicinales

Ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques des plantes ont été isolés et étudiés. Parmi ces composés, l'homme utilise dans son arsenal thérapeutique principalement des hétérosides, des alcaloïdes, des huiles essentielles et des tanins. Les végétaux nous fournissent aussi des vitamines, des oligoéléments et des antibiotiques (Digest, 1997).

- **Phénols** : (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques.

On suppose que les plantes cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales. Le saule blanc (*Salix alba*) contient des acides glucosides phénoliques qui donnent, par distillation, des dérivés de salicylique et de salicylate de méthyle.

- **Huiles essentielles :** (Belaiche, 1979 ; Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. Elles sont largement employées en parfumerie.

Les huiles essentielles contenues telles quelles dans les plantes sont des composés oxygénés, parfois d'origine terpénoïdes et possédant un noyau aromatique. Les huiles essentielles ont de multiples propriétés. Ce sont utilisées en raison de leurs propriétés stimulantes ou inhibitrices notamment dans la désinfection et les activités cellulaires des plantes ou animaux.

- **Flavonoïdes :** (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales et des effets protecteurs sur le foie.

- **Tanins :** (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Les tanins sont des composants polyphénoliques qui contractent les tissus en liant les protéines et en les précipitant d'où leur emploi pour « tanner » les peaux.

Ils permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tannins sont utilisées pour rendre les tissus souples comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure.

- **Anthocyanes** : (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (flavonoïdes proches des flavones) qui donnent aux fleurs et aux fruits leurs teintes bleues, rouge ou pourpre.

- **Coumarines** : (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Les coumarines se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum*) contribuent à fluidifier le sang alors que les furanocoumarines contenu dans le céleri (*Apium graveolens*) soignent les affections cutanées.

- **Saponines** : (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Les saponines prennent leur nom au fait que, comme le savon, elles produisent de la mousse quand on les plonge dans l'eau. Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les triterpénoïdes.

Les saponines triterpénoïdes, contenues dans la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) ont une activité hormonale moindre. Elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments.

- **Anthraquinones** : (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Ce sont les principaux constituants de plantes comme le séné (*Cassia senna*) et la rhubarbe de Chine (*Rheum palmatum*) qui, toutes deux, agissent sur la constipation. Elles ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin provoquent des contractions des parois intestinales et stimulent les évacuations environ dix heures après la prise.

- **Polysaccharides** : (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Ce sont des unités complexes de molécules de sucre liées ensemble que l'on trouve dans toutes les plantes. Du point de vue de la phytothérapie, les polysaccharides les plus importants sont les mucilages visqueux et les graines. Certains polysaccharides comme les glucomannanes et les pectines sont utilisés en cosmétologie.

- **Alcaloïdes :** (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Les alcaloïdes possèdent presque tous une molécule d'azote (-N-) qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains sont des médicaments connus par des vertus thérapeutiques avérées comme l'atropine, présente dans la belladone (*Atropa belladonna*), ont une action directe sur le corps : activité sédatrice, effets sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson).

- **Vitamines :** (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

Bien qu'elles soient souvent négligées, de nombreuses plantes médicinales sont particulièrement riches en vitamines. Le citronnier notamment (*Citrus limon*) contient des doses élevées de vitamine C et la carotte (*Daucus carota*) est riche en β -carotène (provitamine A).

- **Minéraux :** (Bruneton, 1999 ; Iserin, 2001)

De nombreuses plantes médicinales sont très riches en minéraux. Les plantes, notamment celles issues de l'agriculture biologique, tirent les minéraux du sol et les transforment en une structure aisément assimilable par l'organisme. Dans de nombreux cas, les minéraux contenus dans une plante participent activement à son activité thérapeutique dans l'organisme.

2.1.3. Plantes médicinales et systèmes de régulation

La technique la plus ancienne utilisée pour répertorier les plantes médicinales a consisté à identifier la nature et le degré d'efficacité de leurs actions, selon qu'elles ont des propriétés sédatrices, antiseptiques ou encore diurétiques. Souvent, les plantes ont une action plus efficace sur une certaine partie du corps que sur une autre. Ci-dessous, quelques exemples illustrent la manière selon laquelle les plantes agissent sur l'organisme (Iserin, 2001).

1. Peau

- Les antiseptiques, tels que le mélaleuca (*Melaleuca alternifolia*), désinfectent la peau.
- Les adoucissants, tels que le souci (*Calendula officinalis*) calment les démangeaisons.
- Les astringents, comme l'hamamélis (*Hamamelis virginiana*), tendent la peau.

2. Système immunitaire

- Les immunostimulants, comme l'échinacée (genre *Echinacea*) aident le système immunitaire à prévenir les infections.

3. Système respiratoire

- Les antibiotiques, tels que l'ail (*Allium sativum*), améliorent la résistance aux infections des poumons.
- Les émollients, comme la guimauve (*Althaea officinalis*), soulagent les muqueuses.

4. Glandes endocrines

- Les plantes comme le gattilier (*Vitex agnus-castus*) stimulent la production hormonale, en particulier l'hormone sexuelle.
- D'autres comme l'actée à grappes (*Cimicifuga racemosa*), régularisent les règles.

5. Système urinaire

- Les antiseptiques, tels que le buchu (*Barosma betulina*), désinfectent les conduits urinaires.
- Les diurétiques, comme le maïs (*Zea mays*), stimulent la production d'urine.

6. Système musculaire et squelette

- Les analgésiques, tels que le jasmin sauvage (*Gelsemium sempervirens*), soulagent la douleur aux articulations.
- De même, les anti-inflammatoires, comme le saule blanc (*Salix alba*), réduisent les gonflements.

7. Système nerveux

- Les nervins, comme le romarin (*Rosmarinus officinalis*), renforcent le système nerveux.
- Les relaxants, tels que la mélisse (*Melissa officinalis*), le reposent.
- Les sédatifs, comme le gui (*Viscum album*), modèrent l'activité nerveuse.
- Les stimulants, comme le kola (*Cola acuminata*), l'augmentent.

8. Circulation et Cœur

- Les cardiotoniques, comme la sauge (*Salvia miltiorrhiza*), ont des actions variables. Certains ralentissent le rythme du cœur, alors que d'autres l'accélèrent.
- Les stimulants circulatoires, tels que le piment de Cayenne (*Capsicum frutescens*), améliorent la circulation du sang.
- Les diaphorétiques, comme le chrysanthème (*Chrysanthemum morifolium*), provoquent la transpiration et abaissent la tension artérielle.

2.1.4. Utilisation historique des plantes médicinales en Algérie

Chaque culture a une histoire concernant l'utilisation des plantes médicinales pour traiter leurs maux. En Algérie, l'utilisation des plantes médicinales est vieille d'un millier d'années. Les premières écritures sur les plantes médicinales en Algérie et dans le Maghreb remontent au 9^{ème} siècle où Ishâ-Ben-Amran (docteur du prince de Kairouan, de la Tunisie) a laissé de divers traités sur la médecine et les drogues simples (Baba aissa, 2000).

Même pendant le colonialisme Français de 1830 à 1962, les botanistes ont réussi à cataloguer un grand nombre d'espèces comme médicinales et un livre sur les plantes médicinales et aromatiques d'Algérie était publié en 1942 par Fourment et Roques. Ils ont mentionné 200 espèces décrites et étudiées pour la plupart d'elles dans le Nord d'Algérie et seulement 6 espèces du Sahara).

En Algérie, les plantes occupent une place importante dans la médecine traditionnelle. Elles sont largement employées dans divers domaines de la santé. Dans les années dernières, la phytothérapie est très répandue pour traiter plusieurs maladies : diabète, rhumatisme, minceur et même les maladies incurables (Benhouhou, 2005).

2.2. Aromathérapie

L'aromathérapie consiste à utiliser les principes actifs des huiles essentielles extraites à la vapeur d'eau des plantes aromatiques pour le confort ou la prévention et le traitement des pathologies. Elle utilise l'huile essentielles dans son intégralité et non pas une ou plusieurs des molécules extraites de leur composition (Millogo *et al.*, 2005). La présence des composants minoritaires et même des microcomposants est indispensable ici pour l'obtention des effets pharmacologiques recherchés et pour éviter la survenue des effets secondaires indésirables.

2.2.1. Définitions

La pharmacopée française (édition de 1965) donne une définition officielle des huiles essentielles : « *Produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Pour extraire ces principes volatils, il existe divers procédés. Deux seulement sont utilisables pour la préparation des essences officinales : celui par distillation dans la vapeur d'eau de plantes à essences ou de certaines de leurs organes, et celui par expression* ».

En octobre 1987, l'AFNOR (Association Française de la Normalisation) propose une autre définition plus large :

« *Nom générique pour tous les produits lipophiles, volatils, préexistants dans une plante ou une drogue végétale. Une huile essentielle est constituée de nombreuses substances chimiques peu solubles dans l'eau. Dans la plante, celles-ci résultent pour la plupart du métabolisme des terpènes et des composés en C6C3 et sont localisées dans des organes où elles sont biosynthétisées (papilles, cellules et poils, poches, canaux). Les huiles essentielles sont obtenues par distillation à la vapeur, par hydrodistillation (entraînement à la vapeur d'eau) ou encore dans des cas particuliers, par pression mécanique (ex : agrumes) par dissolution dans des*

lipides (enfleurage pour des organes délicats tels que la fleur de Jasmin) et plus fréquemment maintenant dans des gaz supercritiques (dioxyde de carbone). L'extraction par dissolution dans des solvants fournit une fraction chargée de divers constituants liposolubles (cires, hydrocarbures,...) ; après élimination du solvant ou de dioxyde de carbone, on obtient une concrète que l'on prive des constituants indésirables par refroidissement à la température du réfrigérateur (glaçage), suivi de décantation et de filtration ».

Elles contiennent les molécules aromatiques ou odorantes dans un ou plusieurs de ses organes producteurs : feuilles, fleurs, fruits, graines, écorces, racines... toute plante à odeur n'est pas toujours une plante aromatique : le tilleul est un arbre odorant mais il n'existe pas d'huile essentielle de tilleul.

L'huile essentielle est donc l'essence distillée. C'est le résultat de la distillation à la vapeur d'eau des plantes ou arbres aromatiques pour en extraire l'essence. Une essence et une huile essentielle sont deux substances différentes tant en nature qu'en composition, notamment en raison de modifications biochimiques que subit l'essence au cours de sa distillation. Toutefois dans l'usage courant le terme « essence » est souvent utilisé pour parler d'une huile essentielle.

Les huiles essentielles ont occupé une place importante dans la vie quotidienne des hommes qui les utilisaient autant pour se parfumer, aromatiser la nourriture ou même se soigner. La connaissance des huiles essentielles remonte à fort longtemps puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes. Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes. La vapeur dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle (Robert, 2000).

De nos jours, la médecine moderne utilise les vertus thérapeutiques des huiles essentielles et de leurs constituants. En effet, de nombreux composés volatils sont aujourd'hui des ingrédients courants des préparations pharmaceutiques. Le thymol, par exemple, est employé en soins dentaires pour ses propriétés antiseptiques ou encore l'eugénol pour ses propriétés analgésiques (Pauli, 2001). Les huiles essentielles constituent donc une source intéressante de nouveaux composés dans la recherche de molécules bioactives.

2.2.2. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles ce qui en fait des substances fragiles, rares, et précieuses. Ainsi, les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisantes.

1. Hydrodistillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène qui met en jeu l'application de deux lois physiques (loi de Dalton et loi de Raoult). Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un ballon lors d'une extraction au laboratoire ou dans un alambic industriel rempli d'eau placé sur une source de chaleur (Crouzet, 1998).

La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Les vapeurs sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Au laboratoire, le système utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est le Clevenger (figure 6).

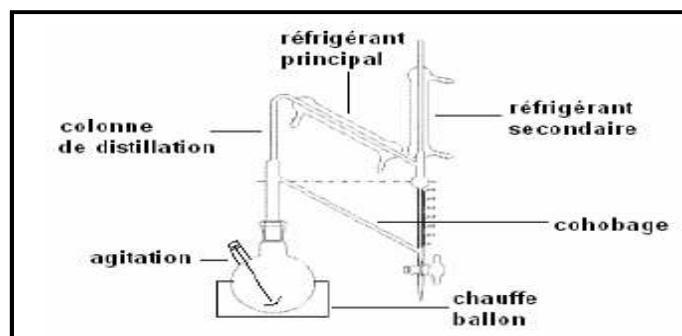


Figure 6 : Montage d'hydrodistillation (Crouzet, 1998).

2. Entraînement à la vapeur d'eau

A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct de l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle » (figure 7).

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle (Garnero, 1996).

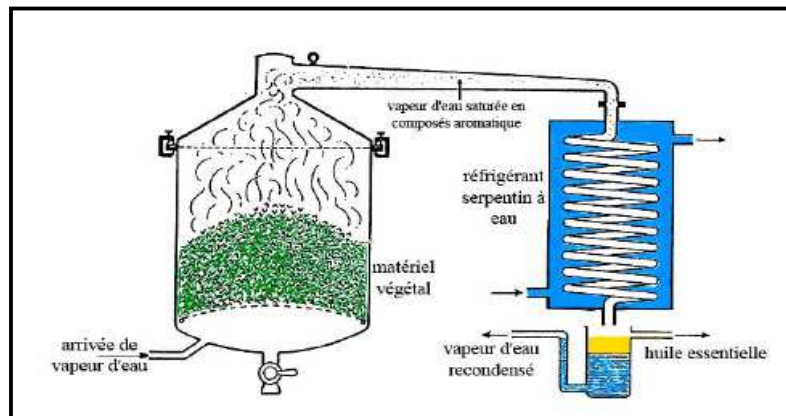


Figure 7 : Montage d'entraînement à la vapeur d'eau (Garnero, 1996).

3. Hydrodiffusion

L'hydrodiffusion est une variante de l'entraînement à la vapeur (Figure 8). Cette technique relativement récente et particulière. Elle exploite ainsi l'action osmotique de la vapeur d'eau. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils et de ne pas mettre en contact le matériel végétal et l'eau (Dugo et Di Giacomo, 2002).

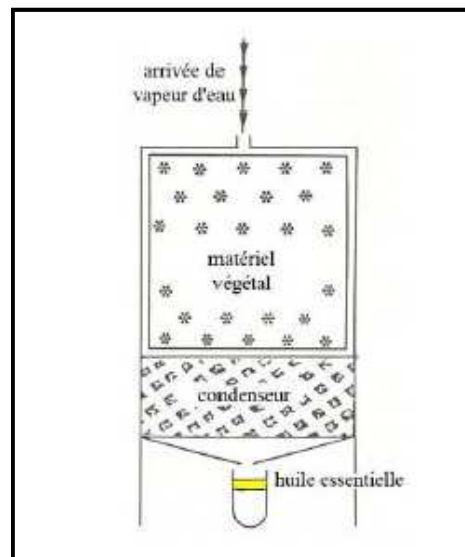


Figure 8 : Montage d'hydrodiffusion (Dugo et Di Giacomo, 2002).

4. Extraction par du CO₂ supercritique

La technique est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état supercritique. Grâce à cette propriété, le dioxyde de carbone permet l'extraction dans le domaine liquide (supercritique) et la séparation dans le domaine gazeux. Le dioxyde de carbone est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie. Il est ensuite injecté dans l'extracteur contenant le matériel végétal. Puis, le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant (Möller, 2008).

5. Extraction assistée par micro-onde

Cette technique d'extraction a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques. Le procédé consiste à irradier par micro-ondes de la matière végétale broyée en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol). Il permet l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les microondes (hexane) pour l'extraction de composés apolaires (Lucchesi *et al.*, 2007).

6. Expression à froid

Le procédé d'extraction par expression à froid est assurément le plus simple mais aussi le plus limité. Il est réservé à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes des hespéridés ou encore d'agrumes qui ont une très grande importance pour l'industrie des parfums et des cosmétiques. Il s'agit d'un traitement mécanique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices. L'essence libérée est recueillie par un courant d'eau et reçoit tout le produit habituel de l'entraînement à la vapeur d'eau d'où la dénomination d'huile essentielle (Dugo et Di Giacomo, 2002).

7. Extraction par solvants volatils

La technique d'extraction « classique » par solvant consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules aromatiques avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique (Moulin *et al.*, 2002). Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone.

2.2.3. Structure chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents. Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes. Seuls les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée, y sont rencontrés soit les monoterpènes (myrcène, pinène, γ -terpinène, etc.) et les sesquiterpènes (P-caryophyllène, α -humulène, P-bisabolène, etc.) (Figure 9).

Rappelons ici que les terpènes sont des composés issus du couplage de plusieurs unités « isopréniques » (C_5H_8), soit deux unités pour les monoterpènes ($C_{10}H_{16}$) et trois pour les sesquiterpènes ($C_{15}H_{24}$). Exceptionnellement, quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent se retrouver dans les huiles essentielles (Gerhard, 2002).

Plusieurs milliers de composés appartenant à la famille des terpènes ont, à ce jour, été identifiés dans les huiles essentielles (Padua *et al.*, 1999). La réactivité des cations intermédiaires obtenus lors du processus biosynthétique des mono- et sesquiterpènes explique l'existence d'un grand nombre de molécules dérivées fonctionnalisées telles que des alcools (géraniol, α -bisabolol), des cétones (menthone, p-vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate de terpinyle, acétate de cédryle), des phénols (thymol), etc. (Figure 10).

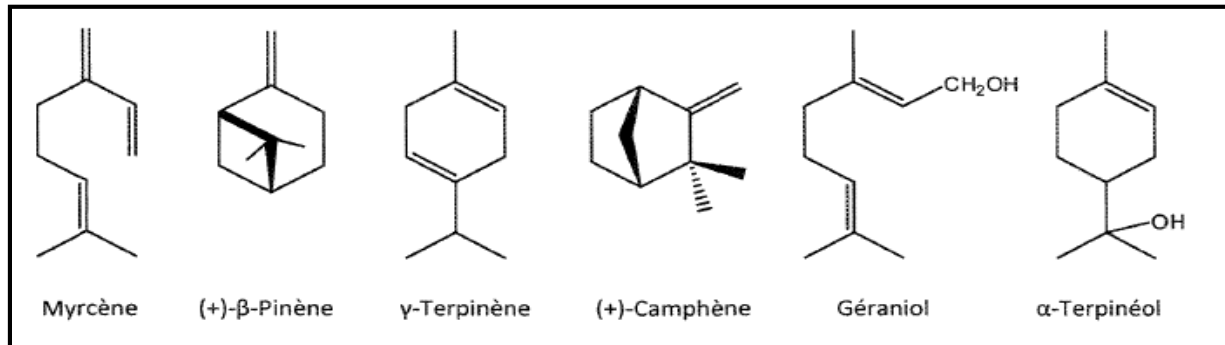


Figure 9 : Exemples de structures de monoterpènes (Padua *et al.*, 1999).

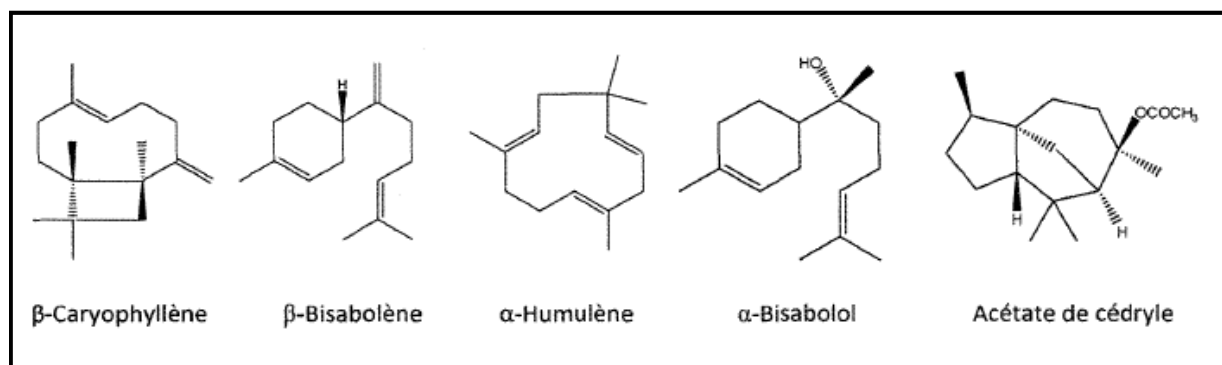


Figure 10 : Exemples de structures de sesquiterpènes (Padua *et al.*, 1999).

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Figure 11) (Kurkin, 2003). Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénoïl, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. Ils sont davantage fréquents dans les huiles essentielles d'*Apiaceae* (persil, anis, fenouil, etc.) et sont caractéristiques de celles du clou de girofle, la vanille, la cannelle, le basilic, l'estragon, etc (Bruneton, 1999).

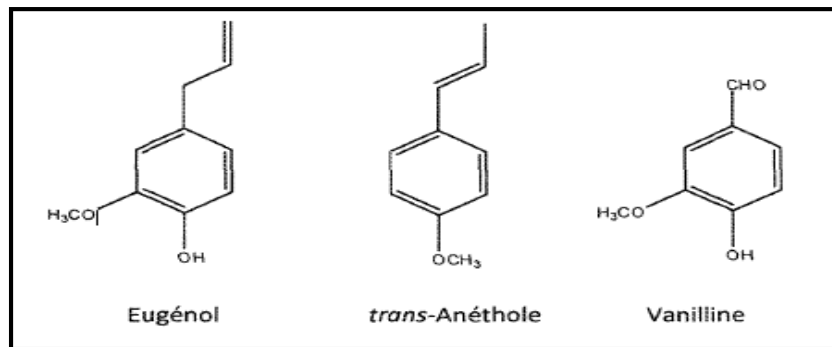


Figure 11 : Exemples de structures de composés dérivés du phénylpropane (Kurkin, 2003).

2.2.4. Propriétés fondamentales des huiles essentielles

Le rôle physiologique des huiles essentielles est aujourd'hui démontré. Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales nombreuses et variées. Chaque huile essentielle ne possède pas qu'une action unique. Elle peut avoir de multiples propriétés : antiseptique, diurétique, tonique, antispasmodique, antirhumatismale, antitussive et autre, et ceci du fait de ses éléments chimiques variés. Si leur composition est complexe, les huiles essentielles sont cependant caractérisées par 2 à 3 composés majoritaires présents relativement en forte concentration de 20 à 70% par rapport aux autres constituants présents parfois sous forme de traces. Ce sont eux qui confèrent aux huiles essentielles leurs propriétés thérapeutiques. Par exemple, le menthol et la menthone représentent respectivement 59 et 19% de la composition de l'huile essentielle de menthe poivrée ou le carvacrol et le thymol respectivement 30 et 27% de l'origan compact (Bakkali *et al.*, 2008).

L'activité de l'huile essentielle dépend donc de sa composition et c'est d'ailleurs ce qui la distingue d'un médicament « classique » lequel se résume souvent qu'à une molécule pour traiter une pathologie. Les molécules aromatiques agissent à différents niveaux et de manières directs ou indirectes. Le composé principal de l'huile essentielle agit sur un trouble mais les éléments secondaires interviennent en synergie ou simplement sur l'état de santé général du patient : stress, fatigue, autre (Bernadet, 2000).

- **Propriétés anti-infectieuses et de défense de l'organisme**

Dans la mesure où elles sont lipophiles, les huiles essentielles passent facilement les parois cellulaires et cytoplasmiques en provoquant des dommages irréversibles pour ces parois. C'est ce qui leur confère une grande cytotoxicité. Elles augmentent notamment les perméabilités de ces parois (Bernadet, 2000).

- **Propriétés anti-inflammatoires**

Les aldéhydes sont doués de propriétés actives contre les états inflammatoires. Ainsi, les huiles essentielles qui en sont riches, sont très utilisées par voie interne ou locales, dans les troubles articulaires inflammatoires. Les huiles essentielles d'eucalyptus citronné, de géranium, de gingembre, de giroflier ont un bon pouvoir anti-inflammatoire (Bernadet, 2000).

- **Propriétés cicatrisantes**

Les huiles essentielles employées contre les affections de la peau ont des propriétés cicatrisantes dues à leur activité physico-chimique et à leur action vasomotrice. Ce sont les huiles essentielles de lavande aspic, palmarosa, Niaouli, ravensare et de romarin (Bernadet, 2000).

- **Propriétés à visée neurotrope**

Les huiles essentielles agissent sur le système nerveux central. Ce sont des huiles à action sédatrice ou à action stimulante. L'action se fait par stimulation ou inhibition du système nerveux périphérique. Les huiles essentielles sont utilisées pour leur pouvoir analgésique. De nombreuses huiles essentielles ont une action antispasmodique qui leur permet d'avoir une action contre certaines douleurs : gastrique menstruelles, musculaires, céphalées, rhumatismes (Bernadet, 2000).

2.2.5. Toxicité des huiles essentielles

Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome. Surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe, en ignorant que certaines sont plus rapidement dangereuses que les autres : absinthe, armoise, chénopode, sauge officinale, hysope, thuya, tanaïs, aneth, rue, anis, carvi. D'autres sont à éviter durant la grossesse, ou interdites aux personnes souffrant d'épilepsie, d'hypertension ou d'affections dermatologiques (Bremness, 1998).

Certains HEs sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol, ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de *citrus* contenant des furacoumarines). D'autres HEs ont un effet neurotoxiques (les cétones comme l' α -thujone sont toxiques pour les tissus nerveux) (Guba, 2001).

En règle générale, les huiles essentielles ont une toxicité aiguë par voie orale faible ou très faible : une DL₅₀ comprise entre 2 et 5 g/kg pour la majorité des huiles couramment utilisées : anis, eucalyptus, girofle....ou le plus fréquemment supérieure à 5 g/kg (camomille, citronnelle, lavande, marjolaine, vétiver, etc.). D'autres ont une DL₅₀ inférieure à 1g/kg : l'huile essentielle de boldo (0.13 g/kg, convulsions apparaissent dès 0.07 g/kg) ; l'essence de moutarde (0.34 g/kg) ; l'origan et la sarriette (1.37 g/kg) ; le basilic, l'estragon et l'hysope (1.5 ml/kg) (Bruneton, 1999).

Tandis que la toxicité chronique est assez mal connue (Bruneton, 1999). Reste à savoir que dans leur emploi externe, les risques de toxicité sont fortement réduits (Bernadet, 2000).

Les huiles essentielles peuvent provoquer : agitation, tremblements généralisés, coma, hématurie, néphrite aiguë, ivresse, congestion cérébrale et pulmonaire, dépression du tonus sympathique, hallucination, spasmes musculaires etc. Dans certains cas, la neurotoxicité de quelques huiles peut nécessiter l'hospitalisation (Bruneton, 1999).

CHAPITRE III.
NOTIONS SUR LES PLANTES
ETUDIEES

3.1. *Rosmarinus officinalis*

3.1.1. Etymologie

Le nom latin *Rosmarinus* est habituellement interprété comme dérivé "ros" de la rosée et "marinus" d'appartenir à la mer, bien qu'elle se développe habituellement loin de la mer. On a affirmé que cette interprétation est un produit d'étymologie traditionnelle, mais probablement le nom original est dérivé du grec "rhops" arbuste et "myron" baume (Heinrich *et al.*, 2006).

3.1.2. Classification du Romarin

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Spermatophytes*

Classe : *Dicotyledones*

Ordre : *Lamiales (Labiales)*

Famille : *Lamiaceae*

Genre : *Rosmarinus*

Espèce : *Rosmarinus officinalis* L. (Quezel et Santa, 1963)

Nom français : Romarin

Nom vernaculaire : Rose marine, encensier, Romarin de troubadours, herbe aux couronnes.

Nom vernaculaire arabe : Iklil El-jabal – Hassalban

Nom targui ou berbère : Ouzghir – Touzala (Elchahat, 2000).

3.1.3. Description botanique de *Rosmarinus officinalis*

Cette plante appartient à la famille des *Labiées* ou *lamiacées*. Elle se présente sous forme d'arbuste, sous arbrisseau ou herbacée (Atik bekkara *et al.*, 2007) mesurant environ de 0,8 à 2 m de hauteur (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007) et est couverte d'une écorce grisâtre. Elle se divise en nombreux rameaux opposés, tortueux. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (on trouve plus rarement la variété à fleurs blanches *Rosmarinus officinalis albiflorus*), hermaphrodites, visibles de janvier en mai. Elles sont groupées à l'extrémité des rameaux à la base des feuilles. Les feuilles opposées décussées insérées sur une tige à section carrée, étroites, lancéolées, linéaires, à bords roulés en dessous, sont vertes foncé et luisantes à la face supérieure (figure 12).

La floraison commence dès le mois de février (ou janvier parfois) et se poursuit jusqu'au avril – mai. Comme pour la plupart des *Lamiacées*, le fruit est un tétramère (de couleur brune), ovoïde, est entouré par un calice persistant et sec. Il attire les insectes (entomophiles) pour assurer la pollinisation (Grégory, 1988).



Figure 12 : Tige principale et rameau feuillé à fleurs du romarin.

3.1.4. Composition chimique de *R. officinalis*

La sommité fleurie et les feuilles du romarin contiennent essentiellement des flavonoïdes, des acides phénoliques -en particulier de l'acide rosmarinique- (à l'origine de ses actions cholérétique et cholagogue), et une huile essentielle (contenant du pinène, du camphène, du cinéole, du bornéol et du camphre) à laquelle il doit son action stimulante (Oluwatuyi, 2004).

La composition chimique de certaines huiles essentielles de Romarin de différents pays est présentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Composants majoritaires d'huiles essentielles de l'espèce *Rosmarinus officinalis* (Oluwatuyi, 2004).

Composé	Localité et % de composé							
	Algérie	Tunisie	France	Grèce	Chine	Afrique du sud	Turque	Iran
α -pinène	5,4	-	20,8	-	19,43	18,18	9,4	14,9
Camphène	7,2	5,9	5,1	-	11,52	6,08	-	-
1,8-cinéole	12,2	33,1	36,9	12,89	27,23	31,12	50,7	7,43
camphre	14,6	18,0	34,2	22,24	14,26	30,12	5,9	4,94
Terpinen-4-ol	-	6,0	-	-	-	-	-	-
Bornéol	10,6	8,0	-	7,37	-	-	6,8	-
Pipéritone	-	-	-	-	-	-	-	23,7
α -terpinéol	5,2	-	-	5,67	-	-	6,8	-
Carbophylleneoxyde	10,9	-	-	-	-	-	-	-
B-pinène	8,5	-	-	-	6,71	-	-	-
Camphrène	-	-	-	-	19,43	18,18	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	14,9

En plus de l'huile essentielle, on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés triterpéniques tels que l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol; des lactones diterpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial, des acides phénoliques, des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque, des acides gras organiques : l'acide citrique, glycolique et glycérique, des stérols, de la choline, du mucilage (Bellakhdar, 1997) et de la résine (Beloued, 1998).

Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique des parties aériennes du romarin a indiqué la présence des flavonoïdes, des tannins et des saponines et l'absence des alcaloïdes détecté dans l'extrait aqueux. Les flavonoïdes détectés par la chromatographie sur couche mince (CCM) sont la quercétine et le kaempférol (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007). Okamura *et al.*, (1994) ont pu isoler de l'extrait hydro-méthanolique des feuilles du romarin trois flavonoïdes glycosylés (lutéoline 3'-O- β -D-glucuronide, lutéoline 3'-O-(4''-O acétyl)- β -D-glucuronide, et lutéoline 3'-O-(3''-O-acétyl)- β -D-glucuronide), ainsi que l'héspéridine.

La première application du système d'électrophorèse capillaire à détection électrochimique a permis la détection de : l'hespéretine, l'acacétine, la diosmétine, l'apigénine, la lutéoline, l'acide férulique, l'acide rosmarinique et l'acide caféique dans les extraits éthanoliques du romarin (Peng *et al.*, 2005).

En 2006, Almela et ses collaborateurs ont identifié par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) dans les extraits méthanoliques du romarin issus de différentes matières (romarin sauvage et distillé) des composés classés en trois groupes : les diterpènes, les flavonoïdes et les acides phénoliques.

18 éléments minéraux ont été identifiés par la spectrométrie d'émission atomique. Les plus abondants sont : Al : 146.48 mg/kg ; Ca : 7791.80 mg/kg ; Fe : 330.16 mg/kg ; K : 14916.23 mg/kg ; Mg : 1634.55 mg/kg ; Na : 2711.87 mg/kg ; P : 1474.60 mg/kg ; Cr : 97.36 mg/kg ; Sr : 74 .65 mg/kg (Arslan *et al.*, 2007).

L'huile essentielle de romarin est un liquide incolore ou jaunâtre dont l'odeur est fortement camphré, pénétrante de saveur très aromatique. Les sommités fleuries fournissent plus de 10 à 25 mL/Kg. Le type Algérien renferme plus que :

- 0,74% dans la plante sèche
- 0,1 % dans les feuilles
- 1,4 % dans les fleurs et rameaux

Le Romarin est relativement riche en l'huile essentielle (1 à 5%). Les organes pouvant renfermer l'huile essentielle sont les fleurs et les feuilles mais la plus haute qualité est obtenue à partir de ces dernières. L'importance de l'huile essentielle de Romarin a été démontrée par le grand nombre d'études publiées décrivant sa composition chimique, ses propriétés biologiques ainsi que ses applications.

3.1.5. Vertus médicinales de Romarin

Le romarin est souvent cultivé pour son huile aromatique et considérée utile pour contrôler l'érosion du sol. Dans la médecine traditionnelle, ses parties aériennes sont utilisées par voie orale pour soulager la colique rénale, les dysménorrhées et comme antispasmodique (Gonzalez-Trujano *et al.*, 2007).

En Espagne, l'huile du romarin est très populaire pour beaucoup de genres de douleur, y compris les douleurs musculaires rhumatismales et traumatiques (Heinrich *et al.*, 2006).

Au Maroc, l'infusion des feuilles est utilisée comme apéritif, cholagogue, stomachique et emménagogue. En usage externe, les cataplasmes faits avec les compresses de la décoction concentrée sont appliqués comme vulnéraires. La poudre des feuilles est saupoudrée comme cicatrisant et antiseptique. La fumigation du romarin est indiquée pour calmer les maux de dents. Depuis quelques décennies, l'huile essentielle du romarin est utilisée en massage sédatif dans les rhumatismes et la sciatique. Les feuilles séchées servent à conserver la laine de l'attaque des mites (Bellakhdar, 1997).

En Turquie, la décoction de feuilles du romarin a été traditionnellement employée pour traiter les diabétiques (Bakirel *et al.*, 2008).

L'infusion des feuilles est tonique, antitussive, carminative, antiasthmatique, fébrifuge, et anti-paralytique (Arnold *et al.*, 1997). On le recommande dans les asthénies, les troubles du foie, contre les dyspepsies atoniques ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire (Poletti, 1988). Il a été également employé en tant qu'analgésique, antiépileptique, diurétique (Soyal *et al.*, 2007), ainsi que pour traiter l'ictère et sa fumée a été employée contre la peste (Heinrich *et al.*, 2006).

L'huile du romarin a été largement répandue pendant des siècles comme un des ingrédients en produits de beauté, savons, parfums, désodorisants, aussi bien pour l'assaisonnement et la conservation des produits alimentaires (Arnold *et al.*, 1997).

3.2. *Populus alba*

Les peupliers sont des plantes supérieures ligneuses Angiospermes Eucotylédones appartenant à la famille des *Salicacées*. Cette famille est composée de deux genres principaux : le genre éponyme *Salix* regroupant entre autres les espèces de saules et d'osiers et le genre *Populus* regroupant les espèces de peupliers (Dickmann et Kuzovkina, 2008). Le peuplier blanc (*Populus alba*) est une espèce eurasiatique qui abonde dans les zones humides d'Europe centrale et méridionale, ainsi qu'en Afrique du Nord. Il croît également en Asie occidentale et centrale, dans l'Himalaya et dans l'ouest de la Chine (Roiron *et al.*, 2004).

Populus alba supporte les hautes températures et un certain niveau d'alcalinité du sol ou de l'eau. C'est ainsi qu'il se trouve presque dans tout le Maroc dans les vallées à sol frais et à fertilité moyenne ; il existe même au Sahara et ne dépasse guère l'altitude de 2000 mètres (Sbay *et al.*, 2003).

3.2.1. Etymologie

Le terme latin *Populus* désigne un peuplier alors que *alba* signifie "blanc" et fait référence à l'écorce blanchâtre de l'arbre et de la couleur blanc argenté du dessous de ses feuilles. Son nom latin de *Populus* provient d'ailleurs du fait que les romains le plantaient sur les lieux publics. A l'état spontané en Algérie du Nord, il est fréquent sur les plateaux mésophiles à xérophiles, le long des cours d'eau encaissés (Roiron *et al.*, 2004).

3.2.2. Classification du peuplier blanc

Règne : *Plantes*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Salicales*

Famille : *Salicaceae*

Genre : *Populus*

Espèce : *Populus alba* L., 1753 (TELA BOTANICA)

Nom français : Peuplier blanc

Nom vernaculaire : Abèle, Peuplier à feuille d'érable, Peuplier argenté, Blanc de Hollande, Aube, Ypréau ou Piboule.

Nom vernaculaire arabe : El-hour Elabyadh

3.2.3. Description botanique *Populus alba*

Le peuplier appartient à la famille des *Salicacées*. C'est un arbre dioïque qui se produit par voie végétative (boutures) et qui est peu sensible au froid.

Les feuilles sont caduques, cotonneux au revers (ce qui donne un aspect blanc à l'arbre), vert foncé sur la face supérieure (figure 13). La forme des feuilles diffère en fonction de leur âge. Elles sont plus ou moins dentelées et sinueuses et plus elles sont jeunes, plus les bords sont ronds. Elles possèdent 3 à 5 lobes et mesurent de 6 à 12 cm de long (Stanton, 2009).

Lorsqu'il est planté dans des conditions acceptables, il s'accroît couramment de un à deux mètres par an en hauteur. Le peuplier peut aisément atteindre des hauteurs de 20 à 30 m et un diamètre d'environ 1 m à 1,20 m au bout de 15 ans (Collinson, 1992). Les rameaux de *Populus alba* sont recouverts d'un duvet blanc et cotonneux. En vieillissant, ils deviennent gris et noueux. Les fruits sont matures au mois de juin, entourés d'un duvet blanc que le vent emporte facilement. L'écorce est d'abord lisse et gris blanchâtre, puis fissurée et plus foncée en vieillissant (Durand, 2009).



Figure 13 : Feuilles et fruits de *Populus alba* (TELA BOTANICA)

3.2.4. Ecologie

De façon générale, les peupliers sont présents aux abords des terrains humides en bordures de rivières ou de fleuves, voire dans les vallées et plaines alluviales temporairement inondées. Ils sont par conséquent, pour la plupart très bien adaptés à des régimes hydrologiques dynamiques (Li, 2000).

C'est une espèce dont les racines ont besoin d'oxygène et se développent dans la terre humide où l'eau provient par capillarité. Les sols les plus favorables sont donc les sols meubles, frais, homogènes, où le plan d'eau se maintient à une distance comprise entre 1 et 2 mètres de la surface. Un bon sol limoneux est idéal (IPCC., 2007).

3.2.5. Utilisation du peuplier blanc

C'est un combustible très médiocre qui produit peu de chaleur à la combustion et produit un charbon de piètre qualité. De l'écorce, on extrait de la salicine. (Jean-Claude *et al.*, 2008). La vitesse de croissance particulièrement élevée de *Populus* assure une production annuelle de près de 1,5 millions de bois d'œuvre ; faisant de lui la deuxième essence feuillue en terme de volume de bois récolté après le chêne. Près de 80 % de cette production est destinée au déroulage et au sciage pour la confection d'emballages dits légers (contreplaqués, panneaux de particules, allumettes) ou lourds (palettes, caisses, menuiserie) (Bonhomme, 2009).

3.2.6. Propriétés thérapeutiques de *Populus alba*

Les principes actifs du genre *Populus* sont connus anciennement en médecine traditionnelle pour avoir différentes activités biologiques telles que des propriétés fongicides, anti oxydantes, anti-tumorales, antiseptiques et antivirales (Greenaway *et al.*, 1991).

Populus alba est utilisé traditionnellement pour ses propriétés dépuratives pour désinfecter les lésions de la peau, traiter l'herpès et la décadence des dents (Adam *et al.*, 2009). Des activités antibactériennes et antifongiques des extraits éthanoliques des feuilles de *Populus alba vis-à-vis* un grand nombre de germes ont été clairement mise en évidence. L'extrait dérivé de la fraction chloroforme des fleurs de *Populus alba* a montré une activité antiprolifératives contre des lignées de cellules cancéreuses (Wamidh *et al.*, 2010).

ETUDE
EXPERIMENTALE

MATERIELS
ET
METHODES

1.1. Objectifs du travail

La médecine par les plantes réunit l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies sévères. Les différentes recherches sur les plantes restent encore aujourd'hui un véritable challenge pour les scientifiques et les professionnels de la santé dans le but de la compréhension des actions alternatives de ces plantes.

Vue ces actions alternatives des plantes, notre travail a pour but d'exploiter des composants bioactifs d'origine naturelle à partir des espèces bien choisies « *Rosmarinus officinalis* et *Populus alba* ». Et même suivre l'efficacité de ses composés dans le traitement d'une maladie sévère affectant la structure osseuse et la stabilité du cartilage articulaire.

Nous avons cherché d'abord à étudier les propriétés physicochimiques et sensorielles des huiles essentielles du Romarin et du Peuplier blanc et même tester la toxicité de ces plantes vis-à-vis le modèle animal choisi. Ceci nous permettra l'évaluation *in vivo* de l'efficacité de ces huiles essentielles dans le traitement des modèles expérimentaux induits par l'arthrose. Comme un second but, on va se limiter à étudier la capacité des huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* pour inhiber les dommages de l'ADN induits par des radicaux libre. Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de sciences de la nature et de la vie de l'université de Mascara en commençant le mois d'Avril 2013.

1.2. Présentation et situation de la zone de récolte

Dans notre étude, nous avons utilisé comme espèce le Romarin «*Rosmarinus officinalis*» et le peuplier blanc « *Populus alba* ». Les deux plantes ont été récoltées de deux zones différentes de la wilaya de Mascara, à savoir El-Mamounia (Mascara) pour *Rosmarinus officinalis* et Sig (Mascara) pour *Populus alba*. Les lieux de récolte ont été déterminés par le logiciel de Google Earth. Les situations géographiques ainsi les étages bioclimatiques des différentes zones de récolte sont représentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Les caractéristiques géographiques et bioclimatiques des sites de récolte

Matière végétale	Station	Latitude	Longitude	Altitude	Etage bioclimatique
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1. EL-Mamounia (Mascara)	35.417616° N	0.124594° E	428,8 m	Semi-aride
<i>Populus alba</i>	2. Sig (Mascara)	35.553211° N	-0.249069° E	50,56 m	Semi-aride

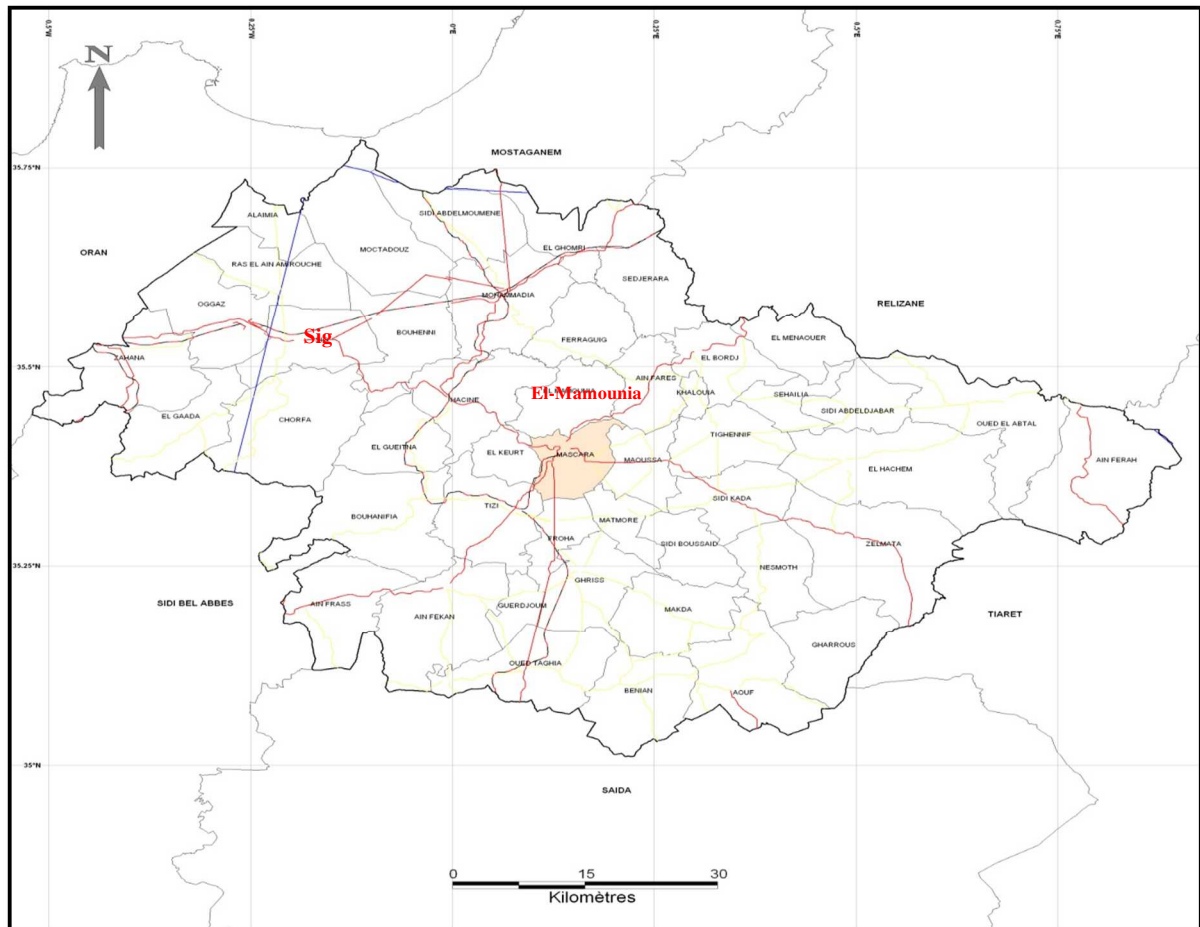


Figure 14 : Carte géographique représentant les sites de récolte.

1.3. Matériel végétal

Il est constitué de la partie aérienne (feuilles et fleurs) des deux espèces de plantes ; *Rosmarinus officinalis* et *Populus alba* qui ont été récoltées durant le mois d'Avril- Mai 2013. L'identification botanique et la systématique des deux espèces ont été confirmées par des enseignants botanistes de la faculté SNV, département de Biologie, université de Mustapha Stambouli –Mascara-. Les deux plantes étaient fraîchement utilisées pour l'extraction des huiles essentielles.



Figure 15 : La partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* (A) et *Populus alba* (B).

1.4. Animaux

Le modèle choisi est le rat albinos adultes de souche Wistar "*Rattus norvegicus*", des deux sexes, de poids corporel moyen de 150 ± 5 g (femelles) et 220 ± 8 g (mâles), fournis par l'animalerie de la Faculté SNV, de l'Université de Mascara. Les rats sont répartis en lots sont gardés à l'animalerie à une température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$ avec un cycle photopériodique naturel. Ils sont nourris avec des granulés alimentaires et de l'eau *ad-libitum* avec les soins et conditions de traitement, conformes aux lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE, 2004).

2.1. Caractérisation physico-chimique des plantes étudiées

2.1.1. Détermination de la teneur en eau

La méthode utilisée est la dessiccation par évaporation (Audigie *et al.*, 1978).

Protocole

Pour déterminer la teneur en eau, nous avons réalisé une dessiccation de la matière fraîche à la température de $103 \pm 2^\circ\text{C}$ dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à une mesure pratiquement constante (Audigie *et al.*, 1978). La teneur en eau est la différence entre le poids de l'échantillon avant et après la dessiccation lorsque leur poids soit constant.

$$\mathbf{H_2O\% = ((M_1 - M_2)/ P) \times 100}$$

H₂O % : taux d'humidité ou teneur en eau.

M₁ : masse en g de la capsule avec l'échantillon avant la déshydratation.

M₂ : masse en g de la capsule avec l'échantillon après la déshydratation.

P : masse en g de la prise d'essai.

2.1.2. Détermination de taux de cendres

La méthode utilisée est la minéralisation par calcination (Pinta, 1980 ; AOAC, 1984).

Protocole

C'est la méthode la plus simple. Elle consiste à un passage au four à une température de 400 à 600 °C jusqu'à la destruction totale de toute particule carbonéuse. La détermination de la teneur en matière organique se fait par le calcul de la différence de poids selon la formule suivante :

$$\mathbf{Teneur\ en\ matière\ organique\ (MO\%) = ((M_i - M_f)/ P) \times 100}$$

Où :

MO : Teneur en matière organique ;

M_i : Masse initiale (avant calcination) ;

M_f : Masse finale (après calcination) ;

P : Masse de la prise d'essai ;

Le taux des cendres est calculé selon la relation suivante :

$$\mathbf{Taux\ de\ cendres\ (C\%) = 100 - MO\%}$$

2.2. Extraction des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles des deux plantes (*Rosmarinus officinalis* et *Populus alba*) a été réalisée au niveau des laboratoires de Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de « Mascara ». L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger.

Principe

L'hydrodistillation consiste à porter à ébullition un mélange {eau + extraits végétaux}. Puis, les vapeurs qui se dégagent seront liquéfiés à l'aide d'un réfrigérant à eau afin de récupérer les huiles essentielles. En effet, les espèces chimiques odorantes que renferment de nombreuses plantes sont faites de molécules peu ou pas solubles dans l'eau mais souvent volatiles.

Initialement mélangées à de l'eau, elles se vaporisent par chauffage en même temps que l'eau et sont entraînées par la vapeur d'eau vers un réfrigérant où elles se liquéfient (ainsi que l'eau). A la sortie du réfrigérant, on recueille un liquide, le distillat ou hydrodistillat. Il est en général formé de 2 liquides non miscibles :

- la phase aqueuse : la plus abondante, est constituée d'eau dans laquelle sont dissoute très peu d'espèces odorantes.
- la phase organique (l'huile essentielle) est constituée des espèces odorantes.

A la fin de l'extraction par hydrodistillation, on ajoute de l'eau contenant de chlorure de Sodium au distillat : cette étape s'appelle le relargage. Elle permet de mieux séparer la phase aqueuse de la phase organique. En effet, les substances odorantes contenues dans l'huile essentielle sont peu solubles dans l'eau et encore moins dans l'eau salée.

Protocole d'extraction

Etape 01 : 100 g de feuilles et fleurs des deux plantes sont hydrodistillés. Quand la température se stabilise, on commence à recueillir le distillat dans un Erlenmeyer.

Etape 02 : Nous ajoutons environ 8 g de chlorure de sodium (NaCl) au distillat. Nous agitons jusqu'à dissolution. Puis, on l'a mis dans une ampoule à décanter.

Etape 03 : Sous hotte, nous réalisons trois lavages successifs (10, 10, 20 ml) de cyclohexane. Après agitation, on récupère la phase organique.

Etape 04 : Nous séchons le produit avec 5 g de sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄). Puis, nous faisons une concentration par le rotavapeur pour obtenir l'huile essentielle.

2.2.1. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huiles essentielles obtenue et la masse du matériel végétal à traité.

$$R_{HE} (\%) = M_{HE} / M_s \cdot 100$$

R : rendement en extrait fixes en g /100g de matière sèche.

M_{HE} : quantité d'extrait récupérée exprimée en g.

M_s : quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

Les huiles essentielles sont recueillies et conservées au réfrigérateur à +4°C dans des bouteilles sombres pour les préserver de la chaleur jusqu'à son caractérisation analytique.

2.2.2. Caractérisation des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Populus alba*

2.2.2.1. Caractères sensorielles et indices physicochimiques

Les huiles essentielles doivent répondre à des caractéristiques analytiques qui sont établies par des normes internationales. Pour connaître la qualité de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et *Populus alba*, nous avons procédé à des essais sensorielles et à des mesures de quelques indices physicochimiques.

Caractéristiques sensorielles : (AFNOR NF ISO 280 : 1999)

- **La couleur :** c'est un paramètre très important. Elle est déterminée à l'œil nu.
- **L'odeur :** mélanger 3 gouttes d'huile essentielle avec 5 ml d'alcool à 90%. Puis, ajouter 10 g de saccharose pulvérisé. L'odeur est semblable à celle de la plante à partir de laquelle l'huile essentielle est obtenue.
- **L'aspect**

Propriétés physicochimiques : (Normes AFNOR, 1992)

- **Mesure du pH :** Cette mesure a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre.
- **Densité relative à 20°C** (NF T 75 111, 1982) : Elle est effectuée à l'aide d'un pycnomètre d'un millilitre de volume, à la température de 20°C
- **Pouvoir rotatoire** (NF T 75 113, 1982) : Elle est obtenue à l'aide d'un polarimètre de type VISTA C25. Source lumineuse (lampe à vapeur de sodium), permettant d'obtenir une lumière de longueur d'onde $589,3 \pm 0,3$ nm. Tube d'observation de $100 \pm 0,5$ mm de longueur.

Mode opératoire

- Dilution de l'huile essentielle des deux plantes : 0,25 g/ 100 mL d'éthanol.
- Remplir le tube avec l'échantillon pour essai, en s'assurant qu'il ne reste aucune bulle d'air interposée.
- Placer le tube dans le polarimètre et lire l'angle de rotation de l'échantillon pour essai sur l'échelle de l'appareil.
- **Indice de réfraction** (NFT 75 112, 1977) : Elle est effectuée à l'aide d'un réfractomètre permettant avec une précision de $\pm 0,0002$ la lecture directe des indices de réfraction situés entre 1,3000 et 1,7000.

Mode opératoire

- Régler le réfractomètre en mesurant les indices de réfraction des produits étalons (eau distillée, d'indice de réfraction 1,3330 à 20 °C) ;

- Vérifier que le réfractomètre est maintenu à la température à laquelle les lectures doivent être effectuées, la température de référence étant de 20 °C ;
- Placer l'échantillon pour essai dans le réfractomètre, attendre que la température soit stable, puis effectuer la mesure.

➤ **Indice d'acide** (NFT 75 103, 1982) : L'indice d'acide est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1 g de substance.

Mode opératoire

Peser 2 g d'HE. Introduire la prise d'essai dans le ballon. Ajouter 5 ml d'éthanol à 95% et 2 à 3 gouttes de phénolphaléine. Titrer le liquide avec la solution d'hydroxyde de potassium (0,1 M) jusqu'à obtention d'une couleur rose persistante pendant 30 secondes. Noter le volume de solution d'hydroxyde de potassium utilisé.

Mettre en réserve le ballon et son contenu pour la détermination de l'indice d'ester.

L'indice d'acide est donné par l'équation suivante : $I.A = V * 5,61/m$

Où :

V : est le volume en millilitres de solution d'hydroxyde de potassium utilisé.

m : est la masse en grammes de la prise d'essai.

5,61 : correspond à 0,1 mole/l de KOH ajoutée.

➤ **Indice d'ester** (NFT 75 104, 1982) : L'indice d'ester est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides libres par l'hydrolyse des esters présents dans 1 g de substance.

Mode opératoire : Cette détermination est effectuée sur la solution provenant de la détermination de l'indice d'acide. Ajouter 25 ml de la solution d'hydroxyde de potassium. Adapter le réfrigérant à reflux au ballon et le placer ensuite sur le manteau chauffant qui sera maintenu sur le ballon pendant une heure.

Laisser ensuite refroidir le ballon et démonter le tube. Ajouter 20 ml d'eau et quelques gouttes de solution de rouge de phénol. Titrer l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique. En parallèle, effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions mais en prenant soin d'ajouter au préalable 5 ml d'éthanol neutralisé (ce volume correspond au volume introduit lors de la détermination de l'indice d'acide).

L'indice d'ester est donné par la relation suivante : $I.E = 28,05 (V_0 - V_1')$

Où :

V₀ : est le volume en mL de la solution d'acide chlorhydrique utilisée pour l'essai à blanc.

V₁' : est le volume en mL de solution d'acide chlorhydrique utilisée dans la détermination de l'I.E.

28,05 : correspondant à 0,5 M de KOH.

La détermination des propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction et de pouvoir rotatoire) est une étape nécessaire mais non suffisante pour caractériser les huiles essentielles. Il est donc nécessaire de la compléter par des analyses chromatographiques CPG/SM.

2.2.2.2. Analyse chromatographique CPG/SM

Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de constituants présents dans une huile essentielle. Les techniques chromatographiques sont les méthodes de référence dans l'analyse des huiles essentielles. Parfois, d'autres techniques spectroscopiques s'avèrent complémentaires (Adam, 2001).

L'analyse des huiles essentielles a été effectuée dans le laboratoire de «plantes médicinales et aromatiques» de l'Université de Kilis (TURQUIE).

L'identification des constituants est réalisée par l'utilisation des indices de rétention sur colonne polaire et apolaire. L'identification des composants individuels est fondée sur la comparaison des indices de rétention (IR) calculés, sur les colonnes polaires et apolaires, avec ceux de composés authentiques ou des données de la littérature (König *et al.*, 2001; NIST, 2005) et des bibliothèques commerciales (Adam, 2001; König *et al.*, 2001).

Pour le cas de nos huiles essentielles obtenues, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui la composent. L'analyse de la partie volatile est réalisée par la technique de chromatographie en phase gazeuse associée avec la technique de spectrométrie de masse (CPG/SM). L'identification des composés chimiques différents a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (TRACE GC-ULTRA, S / N 20062969, Thermo-Fisher) couplée à la spectrométrie de masse (Polaris Q, S / N 210729, Thermo Fisher) (CPG/SM).

L'huile essentielle a été analysée par un Agilent Technologies-GC-MS consistant en un système 6890A GC couplé à un réseau de 5975C détecteur sélectif de masse. La séparation de l'huile essentielle constituants chimiques a été effectuée avec une colonne équipée HP-5 MS capillaire silice fondue (30 m x 0,25 mm, l'épaisseur de film 0,25 µm).

Le 5% -phényl-méthylpolysiloxane a été utilisé pour l'analyse de l'huile essentielle. La température de la colonne a été programmé à chauffer de 60 ° C à 240 ° C à une vitesse de 4 ° C / min. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1,5 ml/min. La température de l'injecteur a été fixée à 250 °C. Un volume d'échantillon de 1 µl a été injecté dans la colonne en utilisant le mode de partage (rapport de division de 1: 100). La détection GC / MS a été effectuée par un système d'ionisation des électrons avec une énergie d'ionisation de 70 eV et la gamme de masse numérisée a été fixé à 50-550 m / z. Les composants d'huile essentielle ont été identifiés sur la base de la comparaison de leurs spectres de masse, de temps de rétention et les indices de rétention avec les composés standards de la banque de données informatisée pour les spectres de masse.

2.3. Test de toxicité aigue

Afin d'éviter tout éventuel risque de toxicité lors des tests biologiques, il est nécessaire de réaliser des essais de toxicité. Afin d'évaluer l'effet toxique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* et même de *Populus alba*, une détermination de l'effet toxique aigu est nécessaire, en mesurant la dose létale 50 (DL₅₀).

Protocole expérimental

Des rats mâles et femelles albinos ont été utilisés. Ils ont un poids moyen de 150 ± 5 g (femelles) et 220 ± 8 g (mâles). Les rats sont divisés, selon le sexe, dans des cages chacune porte 5 animaux.

La toxicité aiguë a été estimée en utilisant la méthode décrite par Tahraoui et ses collaborateurs (2010), qui consiste à répartir les rats, en 05 lots de 10 rats (05 mâles et 05 femelles). Ils ont reçu des doses uniques allant de 0,4 à 1 mg/kg de poids corporel (PC) de l'extrait de l'huile essentielle de *P. alba* et de 1 à 7 mg/kg de poids corporel (PC) de l'extrait de l'huile essentielle de *R. officinalis* et du NaCl 9‰ (témoin) par voie intra-péritonéale. Après l'administration des extraits, les rats sont surveillés en permanence dans la première, 6^{ème} et 24^{ème} heure après le traitement pour toute mortalité ou changement de comportement.

Le suivi des signes cliniques de la toxicité inclue l'observation de l'évolution de poids des rats tout au long de la période de la toxicité aiguë (Adjoungoua et *al*, 2008). Le nombre des rats morts est calculé et transformé en pourcentage.

2.4. Test de tolérance cutanée (IP)

L'application des produits chimiques est susceptible de provoquer des irritations d'intensité variable. Le test de tolérance cutanée a pour but de prédire à partir de la connaissance de la toxicité sur un organisme vivant, le risque toxicologique chez l'homme.

Principe

L'indice d'irritation primaire cutanée de nos extraits a été déterminé selon la méthode officielle publiée au Journal Officiel de la République Française du 21 février 1982. La méthode est fondée sur l'observation des réactions cutanées provoquées par l'application unique du principe actif.

Le dos de chaque animal est divisé en deux zones, après élimination des poils. Sur l'une des zones le produit est appliqué directement, sur l'autre zone, il est appliqué après scarification. Le produit est maintenu en contact par un pansement pendant 24 heures.

Des lectures sont faites 24 heures et 72 heures après l'application afin d'apprécier l'érythème et l'œdème.

Le système de cotation des phénomènes observés permet de dégager par un calcul un indice d'irritation primaire cutanée (IP) pour classer le produit en 4 catégories (Cohen et Pradeau, 1992) :

- Action non irritante, IP inférieur à 0,5 : $IP < 0,5$
- Action légèrement irritante, IP compris entre 0,5 et 2 : $0,5 < IP < 2$
- Action moyennement irritante, IP compris entre 2 et 5 : $2 < IP < 5$
- Action sévèrement irritante, IP compris entre 5 et 8 : $5 < IP < 8$

Protocole expérimental

- La méthode est réalisée sur 06 rats de genre Wistar de poids corporel entre 280 – 350 g.
- Anesthésier les rats par une injection intrapéritonéale du pentobarbital (40 mg/Kg).
- Tondre le dos et les flancs des rats pour dégager une surface d'environ 5cm X 5 cm ; opérer avec précaution de manière à éviter toute irritation (figure 16).
- Effectuer à la droite de l'axe vertébral, à l'aide d'une lame de bistouri stérile, trois scarifications parallèles sur une longueur d'environ 2,5 cm, espacées de 0,5 cm environ. Les scarifications de l'épiderme sont réalisées sans atteindre le derme, c'est-à-dire sans saignement.
- Appliquer le produit sur la peau (zones scarifiées et non scarifiées) à raison de 0,5 g, soit directement, soit après l'avoir déposé sur les pièces de gaze, de manière à éviter toute perte.
- Placer la compresse de protection.
- Enlever le pansement et les pièces de gaze 24 heures après l'application de l'extrait.

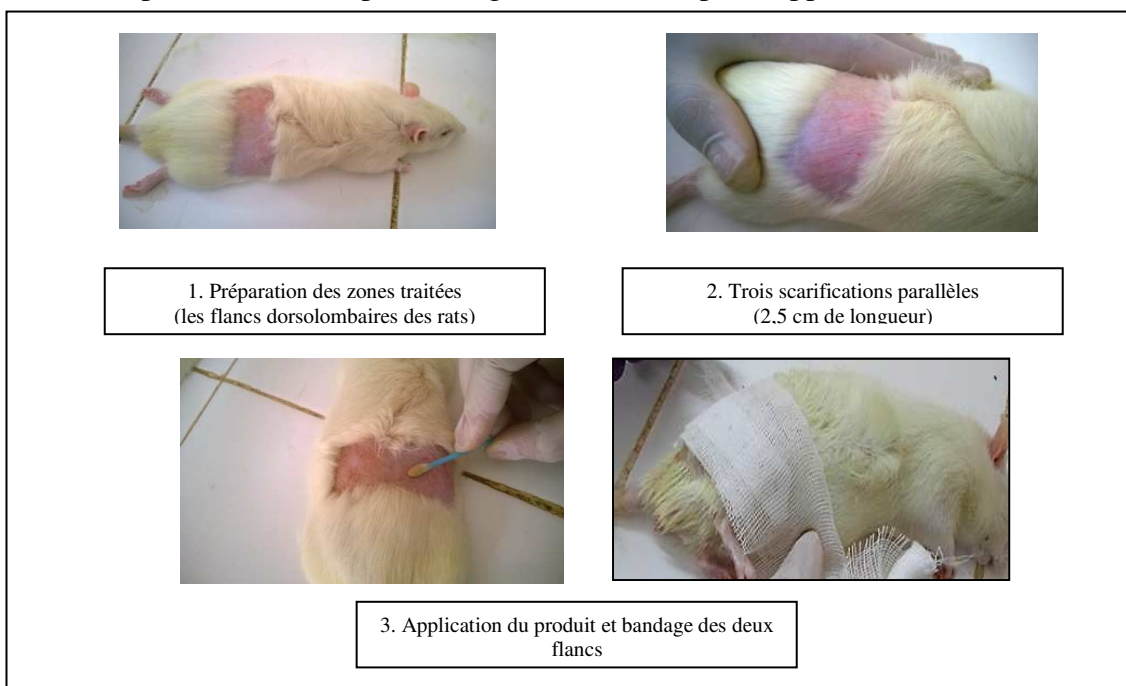


Figure 16 : Les étapes principales du test de tolérance cutanée (IP).

- Les lectures consistent à apprécier l'érythème et l'œdème selon l'échelle numérique du DRAIZE (1959) :

Tableau 5 : Appréciation de l'œdème et l'érythème selon l'échelle numérique du DRAIZE.

Erythème	Pas d'érythème	0
	Léger érythème (à peine visible)	1
	Erythème bien visible	2
	Erythème important	3
	Erythème grave (rouge pourpre) avec ou sans escarres (lésions profondes)	4
Œdème	Pas d'œdème	0
	Très léger œdème	1
	Léger œdème (conditions bien définies, gonflement apparent)	2
	Œdème moyen (épaisseur d'environ 1mm)	3
	Œdème grave (épaisseur supérieure à 1mm)	4

- Pour calculer l'indice d'irritation cutanée (IP), on additionne les chiffres relevés pour l'érythème et l'œdème) à chaque temps de lecture (24 et 72 heures après l'application) sur les six zones scarifiées et les six autres non scarifiées, puis on calcule la moyenne des résultats observés qui sera classée selon l'échelle citée préalablement :

$$\text{IP} = (\text{œdème} + \text{érythème})_{\text{flanc scarifié}} + (\text{œdème} + \text{érythème})_{\text{flanc intact}} / 24$$

Avec : 24 = nombre des rats (6) x nombre des zones testées (scarifiée et intact = 2) x nombre de type d'irritation (œdème et érythème = 2)

2.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles

Pour déterminer les propriétés anti-inflammatoires de l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba*, un modèle d'inflammation expérimentale aiguë et même chronique ont été réalisés.

2.5.1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est caractérisée par les quatre signes cardinaux : douleur, rougeur, chaleur, et tumeur (œdème). De ce fait, l'huile essentielle présente un effet anti-inflammatoire sur la phase aiguë s'elle a la capacité de diminuer ce phénomène. L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire est basée sur la méthode d'induction de l'œdème par l'injection du dextrane au niveau de la patte (Winter *et al.*, 1962).

Le dextrane est un dérivé du glucose. Il est produit naturellement par des microbes vivant dans le sol. Il a plusieurs utilisations médicales : il permet de déterminer la concentration de lipoprotéines en circulation dans le sang. Alors qu'Il peut provoquer l'œdème et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Une inflammation est produite par le dextrane comme une réponse de production des médiateurs de l'inflammation comme l'histamine, la sérotonine, les différentes cytokines et les prostaglandines (Hordé, 2014).

Protocole

Pour réaliser ce type d'inflammation, 20 rats albinos de poids corporel de 200 ± 10 g sont utilisés (tableau 6).

Tableau 6 : Les différents traitements appliqués

Groupes	Type de traitement
Groupe 01 (contrôle)	Solution saline (0,9% de NaCl)
Groupe 02	Huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (250µl/Kg)
Groupe 03	Huile essentielle de <i>P. alba</i> (250µl/Kg)
Groupe 04 (référence)	Suspension de l'Ibuprofène® à une dose de 10 mg/kg de PC (250µl/Kg)

- Les différents traitements ont été administrés par voie orale 1 h avant l'injection du dextrane (figure 17).
- Après 1 h du traitement, les rats ont reçu 0,1 ml d'une solution de dextrane à 1% dans une solution saline dans la région sub-plantaire de la patte arrière droite (Winter, 1962).



Figure 17 : Injection de dextrane dans la région sub-plantaire de la patte du rat

- L'épaisseur de la patte a été mesurée avant et 1, 2, 4 et 6 h après l'injection de dextrane à l'aide d'un pied à coulisse.

Le volume de l'œdème a été déterminé et exprimée en pourcentage de gonflement, par rapport au volume initial de la patte arrière de chaque rat. Puis, le pourcentage de l'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{D_c - D_T \times 100}{D_c}$$

D_C : Diamètre du contrôle

D_T : Diamètre de patte traitée

2.5.2. Inflammation chronique

Modèle animal

En recherche biomédical, un modèle animal est un modèle permettant l'étude de la biologie ou des comportements normatifs, ou d'un processus pathologique spontané ou induit ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalant chez l'humain.

Pour le choix du modèle animal, une attention particulière doit être portée sur les aspects quantitatifs (suffisance de tissus de l'articulation pour l'étude) ou qualitatifs (ressemblance aux tissus humains) (Pritzker, 1994). Plusieurs modèles utilisant de gros animaux ont été établis (chien, chèvre, cheval). Ces modèles demeurent dispendieux et nécessitent une grande période de temps pour le développement de l'arthrose. Ainsi, un petit animal tel que le rat permet de minimiser les coûts alors que les premiers signes de dégénérescence tissulaire peuvent survenir très rapidement.

Tout en étant petit, le rat permet des manipulations chirurgicales efficaces. Il est aussi identifié comme un bon modèle animal pour l'étude de l'arthrose grâce à l'identification de son génome (Hedrich, 2000). Le genou constitue une articulation de choix pour l'étude des pathologies articulaires expérimentales chez le rat car c'est une des articulations les plus volumineuses et la plus facilement accessible. Le choix du modèle d'arthrose s'est tourné vers l'injection intra-articulaire unilatérale d'une solution de mono-iodo acétate (0,3 mg) préparée dans du sérum physiologique et préalablement filtrée.

L'acide mono-iodo-acétique est un dérivé de l'acide acétique. Il réagit avec les résidus de cystéine dans les protéines. C'est un inhibiteur irréversible de toutes les peptidases de cystéine, le mécanisme d'inhibition se produisant à partir de l'alkylation du résidu cystéine catalytique. Il présente des autres effets sur la glycolyse (Polgar, 1979).

Protocol expérimental

Préparation et anesthésie des rats

Les manipulations sont effectuées en respectant le bien être de l'animal, excluant tout état de stress et de nervosité susceptible d'interférer avec les résultats. Au total, 25 Rats Wistar de poids corporel de 220 ± 15 g ont été utilisés dans l'étude des effets des huiles essentielles extraites à partir de *R. officinalis* et *Populus alba*.

Les rats sont placés par 5 dans des cages (tableau 7), avec un accès à une nourriture standardisée et de l'eau *ad libitum*. Les expérimentations débutent après une période d'acclimatation des animaux d'une durée de 7 jours.

Tableau 7 : Les différents traitements appliqués

Groupes	Type de traitement
Lot 01	Rats normaux témoins
Lot 02	Rats malades et Non Traités
Lot 03	Rats malades + Traités avec de l'HE de <i>R. officinalis</i> (250µl/Kg)
Lot 04	Rats malades + Traités avec de l'HE de <i>P. alba</i> (250µl/Kg)
Lot 05	Rats malades + Traités avec Voltum (250µl/Kg)

Les rats choisis dans cette étude doivent :

- Etre exempte de toutes maladies infectieuses, des troubles ostéoarticulaires.
- Dépourvus de toute fracture récente.

Toutes les procédures expérimentales ont été effectuées en conformité avec les directives éthiques pour l'étude de la douleur expérimentale chez des animaux conscients (Zimmermann, 1983), ainsi que la directive du Conseil des Communautés européennes 86/609 / CEE, avec toutes les mesures adéquates sont prises pour minimiser la douleur ou de l'inconfort de les animaux.

Pour l'induction de l'arthrose par le MIA, les rats ont été anesthésiés avec de l'isoflurane (Dunham *et al.*, 1993).

Induction

Le MIA agit directement sur l'équilibre de l'activité métabolique des chondrocytes et induit une perte des propriétés fonctionnelles du cartilage. L'apport énergétique des chondrocytes provient du phénomène physiologique de la glycolyse. Le MIA perturbe la glycolyse en inhibant l'activité de l'enzyme glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, ce qui résulte en une diminution de la synthèse métabolique des cellules et éventuellement à la nécrose (Kalbhen, 1987).

Sous anesthésie de l'animal, l'articulation fémorotibiale est immobilisée et une aiguille est insérée à l'intérieur de la capsule articulaire au travers du ligament patellaire (figure 18). Le MIA a été dissout dans une solution de l'eau physiologique (0,3 mg dissout dans 100 µl de NaCl à 0,9%) et administré dans un volume de 50 µl. Le genou gauche du contrôle a été injecté avec 50 µl d'eau physiologique saline.



Figure 18 : Injection intra-articulaire d'une solution de mono-iodo acétate

Les lectures basales ont été établies à l'aide d'un groupe des rats qui ont été injectés avec une solution saline dans les deux genoux (Guingamp *et al.*, 1997).

Traitement

Le développement d'un traitement doit prendre en considération que les signes et les symptômes varient selon l'articulation atteinte et selon le stade de progression de la pathologie (Lozada et Altman, 2005). Lorsque la pathologie est déjà présente, les thérapies sont dirigées vers les symptômes tels que la douleur, l'instabilité et la faiblesse articulaire et la diminution de la fonction de l'articulation. Les AINS sont les analgésiques les plus communs pour traiter la douleur reliée à l'arthrose (Pincus *et al.*, 2001).

Afin de mettre en évidence l'action de nos huiles essentielles contre ce modèle d'arthrose, un traitement donné aux rats arthrosiques constitué d'une dose de (250 µl/Kg) de chaque huile essentielle (*R. officinalis* et *Populus alba*) et même du médicament Voltum®. La prise de cette dose est effectuée par voie musculaire tout au long de la période du traitement avec un intervalle de 02 jours pour éviter les effets indésirables du médicament Voltum en cas de surdose.

Le médicament Voltum® est un anti-inflammatoire non stéroïdien ayant en plus de son activité anti-inflammatoire une action antalgique et antipyrétique. Le Diclofenac est depuis longtemps l'AINS le plus utilisé dans les rhumatismes inflammatoires chroniques, que dans les dysménorrhées, les poussées aiguës d'arthrose, les lombalgies et les coliques néphrétiques

2.5.2.1. Prise du poids corporel et de la température rectale

L'évaluation comportementale est l'outil primordial pour suivre le niveau de la douleur perçue chez l'animal arthrosique. Le premier signe est la baisse d'activité physique. Certains rats se retrouvent même paralysés des pattes. Il n'est pas évident de détecter cette affection, mais une perte d'appétit et des difficultés à se déplacer sont des signes à prendre au sérieux.

Le poids corporel des rats est mesuré à l'aide d'une balance Sartorius, BP 610, précision : 0,01 g. La prise du poids corporel des rats est effectuée après 7 jours d'injection du MIA. Puis, La croissance des rats est suivie tous les 05 jours durant la période du traitement avec les extraits des huiles essentielles et de Voltum®.

La prise de la température est réalisée à l'aide d'un thermomètre rectale, avec une précision de 1/100 °C.

2.5.2.2. Prise du poids des organes

A la fin du traitement, les rats sont anesthésiés par le chloroforme et sacrifiés pour le prélèvement des organes. Puis, les organes ont été pesés pour mieux comprendre l'action des traitements sur le déroulement de l'activité métabolique (Cœur, Poumons, Foie, Rate, Reins). Le poids des organes est exprimé en (g).

2.5.2.3. Dosage des paramètres biochimiques

Le sang est prélevé tous les 7 jours à travers la veine caudale et il est immédiatement recueilli dans des tubes polyéthylènes étiquetés contenant l'anticoagulant EDTA.

Ces tubes vont subir une centrifugation 4000 tours/min pendant 10 min. Puis, on récupère le sérum résultant. Celui-ci a été conservé à -20 °C jusqu'à la détermination des paramètres biochimiques.

Il est possible de caractériser les événements physiologiques impliqués dans la douleur associée au processus dégénératif de l'arthrose en analysant les variations de concentrations des biomarqueurs de l'inflammation (Poole *et al.*, 2010).

Pour déterminer l'effet des huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* et même de Voltum, le suivi de quelques paramètres biochimiques sera primordial. Les paramètres choisis sont les suivants : la CRP, la Phosphatase Alcaline (PAL), la calcémie, la créatinine, l'aspartate aminotransférase (ASAT), l'alanine aminotransférase (ALAT) :

- Protéine C Réactive (CRP)

Principe

Le CRP LATEX est un test rapide au latex pour la recherche de la Protéine C Réactive (CRP). Les particules de latex, sensibilisées avec des anticorps spécifiques de la CRP humaine, sont agglutinées en présence de sérum de patient contenant la CRP.

- Phosphatase alcaline (PAL)

Principe

L'Alcaline phosphatase (ALP) catalyse l'hydrolyse de p-nitrophenyl phosphate au pH 10.4, en libérant p-nitrophenol et phosphate, selon la réaction suivant :



Le taux de la formation de p-Nitrophenol, mesuré photométriquement est proportionnel à la concentration de la phosphatase alcaline présente dans le sérum (Rosalki *et al.*, 1993).

- **Calcium**

Principe

Le calcium forme avec le complexant crésolphtaléine en milieu alcalin un composé coloré en violet dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium.

- **Créatinine**

Le taux de créatinine est déterminé par une technique enzymatique colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre par un kit de SPINREACT.

Principe

Le test est basé sur la réaction chimique de la créatinine avec le picrate de sodium comme décrit par Jaffe.

La Créatinine réagit avec le picrate alcalin formant un complexe rouge. L'intervalle de temps choisi pour les mesures évite les interférences provenant d'autres constituants du sérum. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de créatinine dans

l'échantillon (Murray *et al.*, 1984).

- **Transaminases (TGO, TGP)**

Le taux des transaminases est déterminé par une cinétique enzymatique colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre par un kit de SPINREACT spécifique pour chaque paramètre.

Transaminase Glutamo-oxalo-acétique (TGO)

Principe

Aspartate aminotransférase (AST) ou Transaminase Glutamo-oxalo-acétique (TGO) catalyse la réaction suivante :



AST : Aspartate aminotransferase



MDH : Malate déshydrogénase

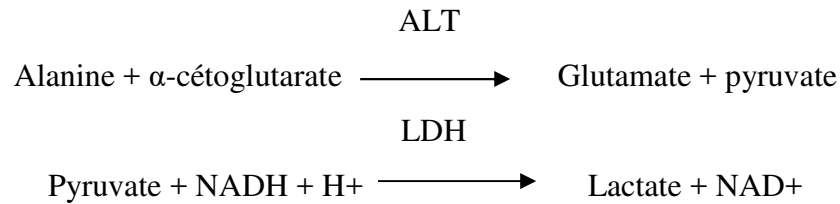
Le taux de diminution de la concentration de NADH, mesuré photométriquement, est proportionnel à la concentration de catalyseur d'AST présente dans l'échantillon (Murray *et al.*, 1984).

Transaminase glutamopyruvique (TGP)

Principe

Alanine aminotransférase (ALT) ou Transaminase glutamopyruvique (TGP) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'alanine à l'acide α -cétoglutarique ont formant l'acide glutamique et l'acide pyruvique.

L'acide pyruvique produit est réduit en acide lactique par lactate déshydrogénase (LDH) et NADH :



Le taux de diminution de la concentration de NADH, mesuré photométriquement, est proportionnel à la concentration de catalyseur d'ALT présente dans l'échantillon (Murray *et al.*, 1984).

2.5.2.4. Analyse radiographique : (McIlwraith, 2002 ; Denoix, 2002 ; Peterfy, 2002)

En clinique humaine, la radiographie conventionnelle par rayon X représente aujourd'hui le plus gros pourcentage des examens d'imagerie médicale. Comme chez l'humain, l'imagerie du petit animal a été d'abord réalisée sur film radiologique avant que des appareils dédiés à l'animal soient développés avec des capteurs numériques plans.

Principe

Cette technique permet une visualisation, en temps réel, de l'image radiante ce qui constitue un avantage substantiel puisqu'elle ouvre la voie à des examens dynamiques. Elle ne permet, en effet, aucun enregistrement des résultats de l'examen. Le principe consiste à impressionner sur un film radiographique les différences de densité d'un organe. Le film sera plus ou moins noirci selon l'organe radiographié. Les os apparaîtront blancs, les tissus mous seront dans différents tons de gris et l'air sera noir.

Protocole

Il s'agit d'une étude qui porte sur 25 rats ayant induits par l'arthrose puis traités par les huiles essentielles de *R. officinalis*, *P. alba* et Voltum. Des radiographies en charge de profil du genou pathologique ont été pratiquées.

- Diviser la cassette Agfa de forme 24/30 en 06 zones égales.
- Mettre la cassette sur la table d'un appareil conventionnel Shimadzu.
- Après désinfection rigoureuse, on met le genou sur la cassette.
- A l'aide d'un tube radiogène, on diaphragme verticalement un faisceau de rayon X vers la cassette.
- Bombarder la cassette avec les constantes : Kv : 48, Masse : 200, Sec : 6,3
- Une développeuse Agfa assure un développement de haute qualité pour les clichés de bromure d'argent dont la largeur ne dépasse pas 36 cm.
- Développer le cliché après impression.

A partir de ces clichés, nous avons classé les genoux selon le score de Kellgren et Lawrence (1957) qui correspond à un index composite prenant en compte à la fois les ostéophytes et le pincement de l'interligne articulaire. Cette classification comporte 4 classes : arthrose douteuse, minime, certaine, évoluée (Tableau 8).

Tableau 8 : Stades radiologiques de la gonarthrose (Kellgren et Lawrence, 1957)

Stades	Etat de gonarthrose
0	radiographie normale
1	ostéophyte de signification douteuse
2	ostéophyte net sans modification de l'interligne articulaire
3	ostéophyte net et diminution de l'interligne articulaire
4	pincement sévère de l'interligne articulaire et sclérose de l'os sous-chondral

- L'analyse radiographique a été réalisée au niveau du service radiographie au sein de l'hôpital de Sig -Mascara-.

2.5.2.5. Analyse histopathologique

L'étude histologique du cartilage peut s'avérer délicate lorsque les seuls moyens mis à disposition sont l'inclusion dans la paraffine de l'échantillon et la coupe de celui-ci par un microtome classique. Lors du prélèvement, les pièces cartilagineuses sont communément liées aux pièces osseuses par la zone d'os sous-chondral, d'où une coupe plus difficile liée à la dureté de l'échantillon. Il faut alors composer avec la diversité des tissus présents dans l'échantillon pour s'assurer d'une qualité optimale de coupe :

A- l'os, tissu calcifié.

B- le cartilage, tissu avasculaire et non innervé, dont les cellules sont appelées chondrocytes

C- les autres types de tissus ne pouvant être éliminés pour éviter la perte de structure du prélèvement comme par exemple le muscle, le tissu adipeux ou le tissu fibreux.

Protocole

Prélèvement tissulaire «Biopsie »

Après sacrifice des rats dans le 28^{ème} jours, les biopsies de cartilage provenant des plateaux tibiaux des genoux arthrosiques des rats sont fixés dans du formol (10%) pendant 24 heures (Glasson *et al.*, 2010).

Fixation des tissus

Les échantillons sont ensuite décalcifiés dans l'EDTA 14% pendant 15h. La vérification du point final de décalcification est effectuée par méthode chimique en utilisant la méthode d'Arnim (Luna, 1992). Brièvement, 5 ml d'hydroxyde d'ammonium à 5% et 5 ml d'oxalate d'ammonium à 5% sont ajoutés à 5 ml de la solution de décalcification où sont plongés les échantillons, puis vortexés vigoureusement. Si aucun précipité blanc d'oxalate de calcium n'apparaît au bout de 15 min d'attente, la décalcification est achevée. Dans le cas contraire, la solution de décalcification doit être renouvelée jusqu'à validation du processus.

Imprégnation et inclusion

Les échantillons sont alors rincés abondamment plusieurs fois dans du tampon phosphate salin avant de poursuivre leur traitement par la déshydratation en alcools 70°, 95° et 100°, la clarification par le xylène, l'imprégnation et l'inclusion dans la paraffine. Les blocs de paraffine sont placés sur plaque froide avant d'être coupés.

Coupes et coloration

La coloration histologique d'hématoxyline-éosine-safran (HSE) est ensuite réalisée sur des coupes de 5 µm d'épaisseur effectuées avec un Microtome LEICA RM2235.

La coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) est une coloration standard qui permet d'apprécier l'aspect général du tissu. Elle permet aussi de visualiser les cellules et les constituants matriciels.

L'hématoxyline (0.5 %, 5 min) colore les noyaux en bleu foncé, l'éosine (1 %, 5 min) se fixe sur les éléments acidophiles et leur confère une coloration rose (cytoplasme, fibres nerveuses, fibres élastiques et musculaires) et le Safran (1%, 5 min) se lie aux collagènes et à certaines protéines telle que la chondrine (coloration jaune).

La coloration des coupes est obtenue grâce à des bains colorants automatiquement :

- 1-** Déparaffiner la coupe : Plonger la lame dans le premier bain de xylène ou toluène pendant 2 minutes.
- 2-** Hydrater la coupe : Pour faire disparaître le xylène faire passer la lame dans trois bains d'alcool (100°, 95° et 75°) absolu pendant des durées de 2 minutes. Faire passer la lame dans l'eau courante pendant 10 secondes.
- 3-** Coloration à l'hématoxyline Harris : Plonger la coupe bien hydratée dans un bain d'hématoxyline pendant 05 minutes. Faire un lavage à l'eau courante pendant 10 secondes puis dans l'acide chlorhydrique pendant 8 secondes et les carbonates de lithium pendant 10 secondes et laver à l'eau pendant 10 secondes .
- 4-**Déshydratation : se passe dans un bain d'alcool de 95° pendant 1 minute.
- 5-** Coloration à l'éosine : Plonger la lame dans le bain d'éosine pendant 10 secondes. Puis, une autre déshydratation à l'aide de 02 bains d'alcool de 100° pendant 2 minutes, puis dans le xylène ou toluène pendant 02 minutes.

La coupe colorée est protégée par une lamelle de verre collée ou par un film plastique transparent. Elle est alors prête à être analysée au microscope par un médecin anatomopathologiste.

Les étapes de l'étude histologique jusqu'au l'obtention des coupes ont été réalisées au niveau de laboratoire d'anatomo-pathologie d'hôpital « MESLEM Taib» de Mascara alors que la coloration hématoxyline-éosine-safran automatique et la lecture des lames ont été réalisées au niveau du service pathologie d'hôpital de Sidi bel Abbes.

Les échantillons histologiques ont été classés en utilisant un score modifié de Mankin. Il a proposé en 1971 le HHGS (Histological Histochemical Grading System) qui utilise un score de 14 points basés sur les modifications de structure du cartilage, les changements cellulaires, l'intensité de la coloration à la Safranine O, les fissures, les fentes, la vascularisation, la saturation du cartilage articulaire et l'intégrité de la plaque osseuse sous-chondrale. Pour faciliter l'utilisation de cette échelle, il est préférable de la diviser en niveaux ou grades :

- 0-2: Normal
- 3-5: Grade arthrose I
- 6-7: Grade arthrose II
- 8-10 : Grade arthrose III
- 11-14 : Grade arthrose IV

Ce système est jugé comme valide pour les stades modérés et sévères mais non valide pour les stades précoces et légers par certains auteurs (Ostergaard, 1999). Ce système présente 3 limites à prendre en compte lors de son utilisation : il manque de linéarité pour les stades précoces et légers. De plus, il s'agit d'une évaluation sous forme de grade, insuffisante pour évaluer des cartilages présentant des lésions différentes au sein d'un même échantillon, autrement dit, il manque d'un facteur « stade » dans cette évaluation.

2.6. Activité protectrice des huiles essentielles contre les dommages de l'ADN

Les radicaux libres, communément appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO), contiennent un ou plusieurs électrons dans leur orbitale plus à l'extérieur. Quelques exemples d'espèces réactives de l'oxygène sont peroxy radical (ROO^\cdot), anion superoxyde (O_2^-), peroxy (ROO^*), l'ozone (O_3), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et un groupe hydroxyle réactif (OH^\cdot) (Devasagayam *et al.*, 2004). La production excessive de radicaux libres se traduit par déplétion d'antioxydants *in vivo* et provoque un déséquilibre entre les radicaux libres et les défenses antioxydantes de l'organisme. Ce qui peut causer des dommages (stress oxydatif). Environ 100 maladies graves ont été associées au stress oxydatif, y compris les maladies cardiovasculaires, les maladies du foie, diabète, le cancer, les maladies neurodégénératives et le vieillissement. Ils sont bien connus pour endommager l'ADN cellulaire (Hancock *et al.*, 2001 ; Spector, 2000).

Les propriétés pharmacologiques des plantes médicinales ont été largement étudiées et il est rapporté pour montrer les différentes activités antioxydantes (Aslam *et al.*, 2011). Donc, notre étude a été conçue pour évaluer la capacité des huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* pour inhiber les dommages de l'ADN induits par les radicaux libre.

Clivage de l'ADN induite par peroxyde d'hydrogène / photolyse par UV

L'induction de la scission de l'ADN par le réactif de Fenton a été mesurée sur l'ADN du plasmide pBR322 selon le mode opératoire décrit par Russo *et al.*, (2000) et Lee *et al.*, (2002). L'expérience a été effectuée par l'ajout d'un volume de 20 µl contenant 33 µM en pb de l'ADN du plasmide pBR322 dans un tampon phosphate salin 5 mM (pH 7,4). Ce mélange est additionné avec les différentes concentrations de l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* (25 µg / ml, 50 µg / ml, 100 µg / ml et 200 µg / ml). Immédiatement avant l'irradiation des échantillons avec de la lumière UV, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été ajouté à une concentration finale de 2,5 mM. Les volumes de réaction ont été organisés dans les calottes de tubes à centrifuger en polyéthylène, placés directement sur la surface d'un transilluminateur (8000 µW. cm⁻¹) à 300 nm.

Les échantillons ont été irradiés pendant 5 min à la température ambiante. Après irradiation, 4,5 µl d'un mélange, contenant 0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylene cyanol FF et 30% glycérol, ont été ajoutés à la solution irradiée. Les échantillons ont ensuite été analysés par électrophorèse sur un 1% du gel d'agarose horizontale dans un tampon Tris - borate (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA). Le plasmide pBR322 non traité a été inclus comme témoin dans chaque série d'électrophorèse sur gel, menée à 1,5 V / cm pendant 15 h. Puis, le gel a été coloré au bromure d'éthidium (1 µg / ml, 30 min) suivi par une décoloration dans l'eau à 30 min. Puis, le gel est photographié sur un film positif de Type Polaroid- 667.

L'étude de l'activité protectrice des huiles essentielles contre les dommages de l'ADN a été effectuée dans le laboratoire de ☐plantes médicinales et aromatiques☐ de l'Université de Kilis (TURQUIE).

2.7. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± Ecart-type (Moyenne ± ET). Les résultats des différents tests sont analysés par le test ANOVA à un seul facteur pour les comparaisons multiples. Les valeurs de p inférieur à 0,05 (p<0,05) sont considérées statistiquement significatives.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

2.1. Caractérisation physico-chimique des plantes étudiées

2.1.1. Teneur en eau et taux de cendres

Afin de déterminer la teneur en eau dans l'espèce de *R. officinalis* et *P. alba*, nous avons utilisé la méthode d'Audigie *et al.*, (1978) dont le but est d'exprimer les résultats des constituants biochimiques par rapport à la matière sèche. C'est la détermination de la perte de masse par dessiccation à l'étuve. Ainsi, le taux de cendre des deux espèces a été déterminé après incinération. La cendre grisâtre obtenue représente les diverses substances minérales. Les végétaux sont riches en eau. Les plantes fraîches renferment 60 à 80 % d'eau (Paris et Moyse, 1965). Les résultats obtenus suite à une dessiccation et à une incinération sont représentés dans les graphes ci-dessous :

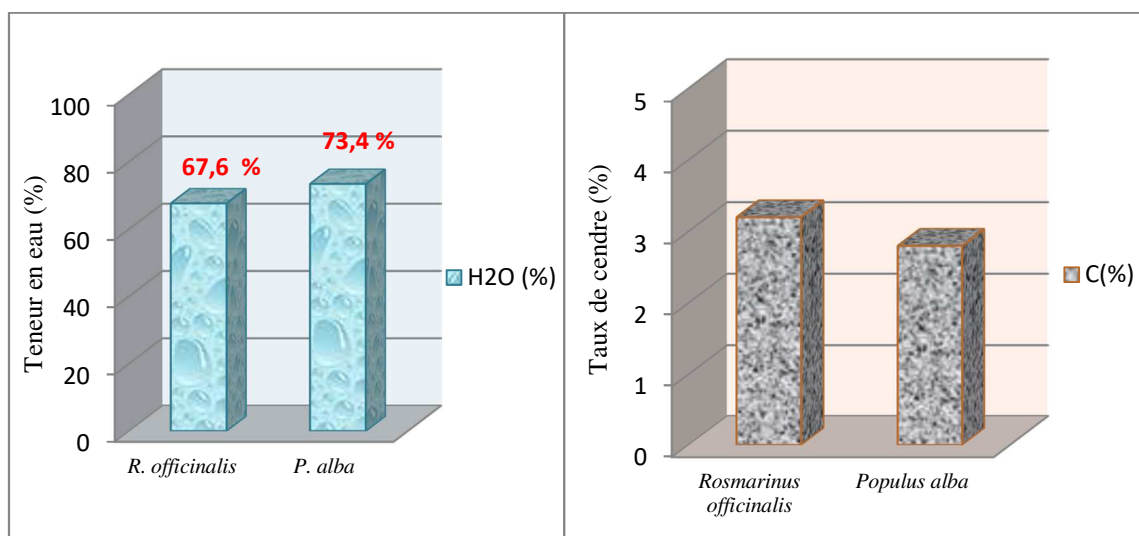


Figure 19 : La teneur en eau (H₂O%) et le taux de cendre (C%) des deux plantes étudiées.

La teneur en eau de nos échantillons est de l'ordre de : 67.6 % pour le romarin et 73.4 % pour le peuplier blanc. Albu et ses collaborateurs, (2004) ont trouvé une teneur en eau de 40% dans les feuilles fraîches du romarin. Cette teneur diffère de façon remarquable avec nos résultats (figure 19).

Nous remarquerons, toute fois que les deux plantes ont présenté des taux de cendres légèrement différents. Les variations rencontrées dans la teneur en eau et le taux de cendres de nos échantillons comparés à certains travaux antérieurs peuvent être dues à certains facteurs écologiques, l'âge de la plante, la période du cycle végétatif ou même à des facteurs génétiques (Laurent, 1991).

2.2. Analyses des huiles essentielles

2.2.1. Rendement d'extraction

Après l'extraction et l'élimination de toute trace de solvant, le rendement est calculé selon la formule ci-dessous.

$$R_{HE} (\%) = M_{HE} / M_s \cdot 100$$

La teneur en huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes (feuilles + fleurs) est de $1.29 \pm 0.03\%$ pour le Romarin et $0.9 \pm 0.08\%$ pour le Peuplier blanc (tableau 9).

Tableau 9 : Rendement d'extraction

Matière végétale	Masse de la plante (g)	Masse d'extrait (g)	Aspect	Couleur	Rendement (%)
<i>R. officinalis</i>	850	11	Huileux	Jaunâtre	1.29 ± 0.03
<i>P. alba</i>	850	7.8	Huileux	Jaune pâle	0.9 ± 0.08

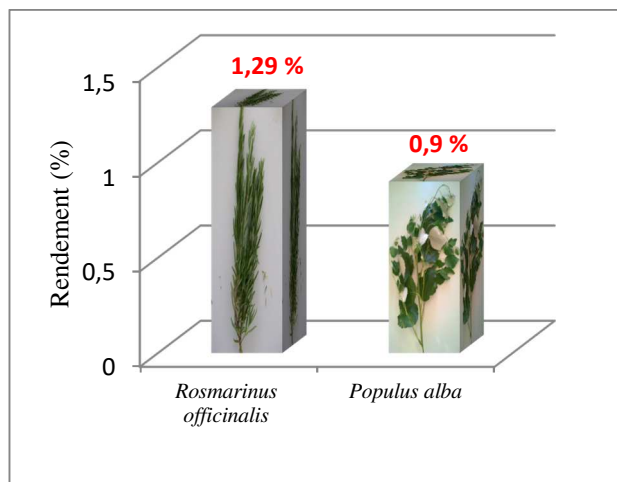


Planche 1 : Aspects des HE des deux espèces

Figure 20 : Les rendements d'extraction

Les rendements en huiles essentielles des deux espèces sont largement variables (figure 20). Le rendement de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* de la région de Mascara est apparu supérieur à celui d'Alger, de Tlemcen et de Batna. D'après Djeddi *et al.* (2007), le rendement du romarin d'Alger a été estimé à 0,82%, et celui de Tlemcen à 0,6% d'après Atik Bekkara *et al.* (2007) et celui de Batna à 0,9 % d'après Rouabeh (2010). La teneur en HE du romarin a été également en dessus de celle du Maroc avec 0,54% (Derwich *et al.*, 2011).

En effet, le rendement d'extraction, tout comme la qualité d'une HE sont influencés par la nature du sol sur lequel la plantation est effectuée, le matériau des appareils utilisés, la propreté du matériel, la pression de fonctionnement, la régularité de la chauffe, le refroidissement du distillat et la régularité de sa coulée, la méthode et la durée de distillation, etc (Bruneton, 1993 ; Brulé et Pecout, 1995 ; Bennadja *et al.*, 2013).

2.2.2. Propriétés sensorielles et indices physicochimiques

L'huile essentielle des deux plantes est fractionnée de telle façon qu'on peut déterminer ses propriétés organoleptiques (apparence, couleur, odeur), des propriétés physicochimiques (pH, densité relative à 20 °C, pouvoir rotatoire à 20 °C, indice de réfraction à 20 °C, indice d'acide et indice d'ester) qui leur sont propres. C'est grâce à eux qu'il est possible de définir si une huile est de qualité adéquate. Les propriétés organoleptiques des huiles essentielles obtenues des deux espèces suggèrent une huile essentielle de très bonne qualité.

Pour l'HE de *R. officinalis*, c'est une HE d'un aspect liquide huileux, de couleur jaune avec une odeur puissante des fleurs de romarin. Alors que pour l'espèce *P. alba*, l'HE a été d'un aspect liquide huileux, de couleur jaune pâle.

Les huiles essentielles ont été analysées selon la méthode standard AFNOR. Le tableau 10 regroupe les résultats propres à la mesure de ses constants physicochimiques.

Tableau 10 : Propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du romarin et peuplier blanc.

Propriétés		HE de <i>R. officinalis</i>	HE de <i>P. alba</i> .	Valeurs de références	Références
Propriétés physiques	Densité relative	0,915	0,9	0,895 – 0,920	NF ISO 1342
	Pouvoir rotatoire	+ 2°	+3°	- 3° ≤ [α] ²⁰ _D ≤ +16°	NF ISO 1342
	Indice de réfraction	+ 1,469	+1,470	+1.4670 ≤ n ²⁰ _D ≤ +1.4740	NF ISO 1342
Propriétés chimiques	pH	6,05	6,11	6 - 7	////////////////////
	Indice d'acide	0,521	0,530	0,5 - 2	ISO 709:2001
	Indice d'ester	28,1	18,3	-----	ISO 709:2001

Remarque

L'AFNOR ne donne aucune indication sur les valeurs des indices physicochimiques de l'huile essentielle de *P. alba*. Ceci ne nous permet pas de faire un commentaire sur les valeurs trouvées.

Le pH

La mesure du pH a donné une valeur de 6,05 et 6,11 respectivement pour l'HE de *R. officinalis* et *P. alba*.

La densité

La norme AFNOR (2005) préconise une densité comprise entre 0,895 – 0,920 pour les huiles de très haute qualité. Avec une densité de 0,915 et 0,90 respectivement pour l'HE de *R. officinalis* et *P. alba*, il y a lieu de suggérer que nos huiles sont au moins de bonne qualité.

Pouvoir rotatoire

Dans notre cas, cet indice a touché une valeur de +2 et +3 respectivement pour l'huile obtenue de la plante de *R. officinalis* et *P. alba*. Selon la norme NF ISO 1342-Mars 2001 relative à l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis L.*), il est apparu que cette huile essentielle est conforme à cette norme.

Indice de réfraction

L'indice de réfraction est considéré comme un critère de pureté, également utilisé pour identifier des huiles. Chaque substance a son indice de réfraction. En effet, la norme AFNOR(2005) prévoit pour l'huile essentielle l'indice de réfraction compris entre 1,495 pour les huiles de haute qualité et 1,513 pour les huiles de moindre qualité). Dans notre cas, cet indice a touché une valeur de +1,469 et +1,470 respectivement pour l'huile obtenue de la plante de *R. officinalis* et *P. alba* (tableau 10). Donc, il est apparu que nos huiles sont de bonne qualité.

Indice d'acide

En réalité, une huile essentielle fraîche contient très peu d'acides libres (Fauconnier, 2006). L'indice d'acide (IA) doit être le plus petit possible. Notre HE a donné un IA de 0,521 pour le *R. officinalis* et 0,530 pour *P. alba*. Ce résultat s'explique par le fait que nous avons pris soin de conserver nos HEs dans un contenant en verre opaque car il a été établi que la lumière favorise l'altération de la structure de l'huile et la prolifération des acides. De même, un indice d'acide inférieur à 2 est un indicateur d'une bonne conservation de l'huile.

Indice d'ester

Plus l'indice d'ester est élevé, la qualité d'une HE sera mieux (Dummortier, 2006). Nos HEs révèlent un indice d'ester (IE) de 28,1 pour le *R. officinalis* et 18,3 pour *P. alba*.

Selon les propriétés physico-chimiques, plus la qualité de l'huile est élevée, plus sa densité et son indice d'ester seront aussi élevés. Par contre, l'indice de réfraction et le pouvoir rotatoire doivent être petits. Quant à l'indice d'acide, il doit toujours être inférieur à 2.

La comparaison de nos résultats à ceux de la norme NF ISO 1342 – Mars 2001 relative à l'huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) a montré clairement que l'huile essentielle issue de romarin est d'une part conforme à la norme ISO.

2.2.3. Analyse chromatographique CPG/SM

Les composants chimiques déterminés dans les huiles essentielles sont données dans les tableaux 11 et 12. L'analyse chromatographique CPG/SM nous a permis d'identifier Vingt et un composés dans l'huile essentielle de *R. officinalis*. Les principaux constituants (> 5%) dans l'huile essentielle de *R. officinalis* sont : le camphre (22,35%), Verbénone (23,48%), Borneol (16,63%) et l'eucalyptol (11,73%). En outre, l'huile essentielle testée contient également des quantités considérables de divers constituants mineurs (tableau 11).

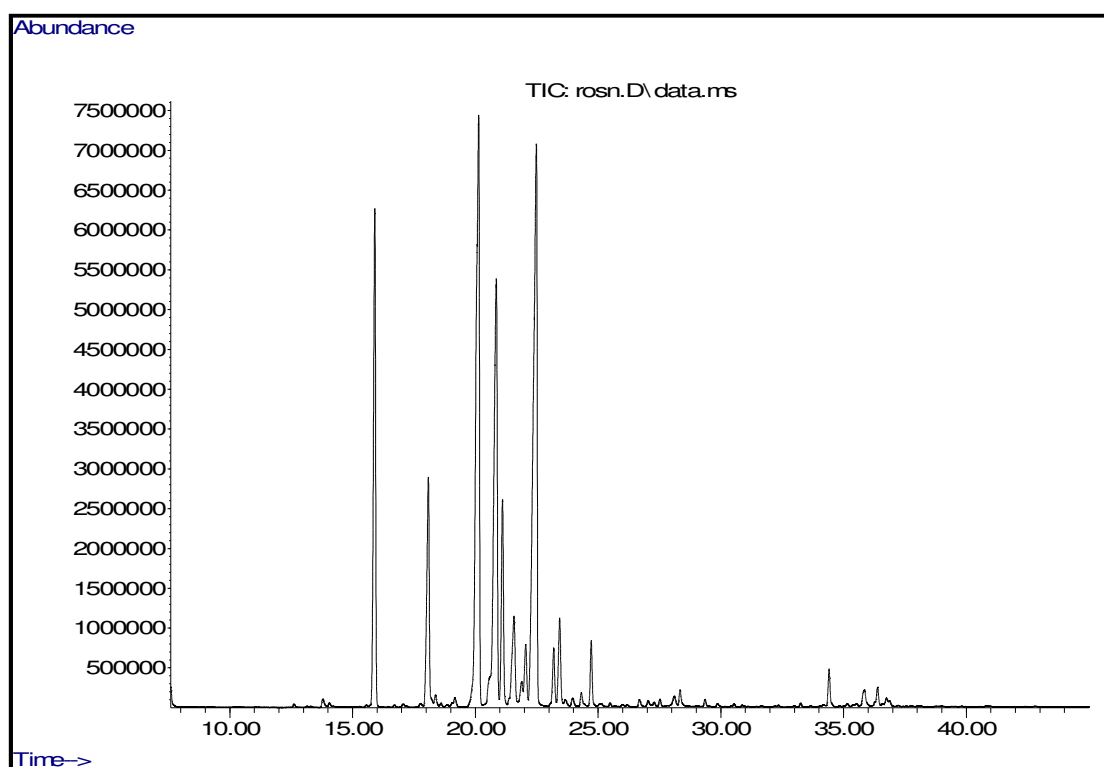


Figure 21 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Tableau 11 : La composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*.

Pics	Constituants	Temps de rétention (min)	Indice de rétention	Pourcentage (%)
1	1-Octen-3-ol	13,783	972,7832	0,20
2	Eucalyptol	15,904	1036,741	11,73
3	Linalool	18,083	1097,721	6,38
4	Chrysanthène	18,373	1106,324	0,32
5	Chrysanthène	19,163	1130,285	0,35
6	Camphor	20,131	1158,333	22,35
7	Borneol	20,85	1178,307	16,63
8	Isopinocampone	21,104	1185,199	4,84
9	α -Terpinol	21,571	1197,656	3,32
10	Myrtenol	21,881	1206,962	0,72
11	3-Cyclopentène-1-éthanol, 2,2,4-triméthyl	22,05	1212,239	1,67
12	Verbenone	22,479	1225,455	23,48
13	Grandlure II	23,193	1246,9	1,33
14	5-Caranol	23,435	1254,019	2,10
15	p-Mentha-1,8-dien-3-one	24,317	1279,358	0,35
16	Bornylacétate	24,723	1290,714	1,36
17	3,5-Heptadiène, 2-éthylidène-6-méthyl	28,098	1393,836	0,39
18	Méthyleugénol	28,34	1401,019	0,41
19	α -Caryophyllèneoxyde	34,41	1602,227	0,94
20	Sabinène	35,848	1654,473	0,63
21	β -Caryophyllèneoxyde	36,385	1673,447	0,49

Il existe de nombreuses études dans la littérature sur la composition chimique de l'huile essentielle de *R. officinalis* (Celiktas *et al*, 2007 ; Bousbia *et al*, 2008). Plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de multiples composés bioactifs dans l'huile essentielle de *R. officinalis* dans différentes régions d'Algérie (Benhabiles et Aït Ammar, 2001 ; Lograda *et al.*, 2014). Le chromatogramme de l'huile essentielle de *R. officinalis* a montré des spectres avec pourcentage élevé en Verbenone, Camphre, Borneol et Eucalyptol dans le groupe des monoterpènes.

D'après les résultats obtenus, la nôtre s'avère être du type Camphre/ Verbenone car ces deux molécules sont majoritaires dans l'HE. Nos résultats sont en accord avec les études de Miladi *et al.*, (2013) et Kukerja *et al.*,(2007). Ils ont également identifié le camphre comme un composant principal dans l'huile essentielle de *R. officinalis*. Alors que, Ayadi *et al.*, (2011) a identifié le verbénone comme un composant principal dans l'huile essentielle de *R. officinalis*.

Les variations rencontrées dans la composition chimique du point de vue qualitatif et quantitatif de nos échantillons comparés à certains travaux antérieurs peuvent être dues à certains facteurs écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et la période du cycle végétatif ou même à des facteurs génétiques (Hussain, 2009 ; Anwar *et al.*, 2009).

Les procédés qui utilisent l'eau peuvent induire l'hydrolyse des esters et aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations, des oxydations,...etc (Bruneton, 1993).

Alors que l'analyse chromatographique CPG/SM de l'huile essentielle de *Populus alba* nous a permis d'identifier Vingt-deux composés. Les principaux constituants (> 5%) dans l'huile essentielle de *Populus alba* sont : 1,8-Cineole (38,02%), β -Eudesmol (20,58%), δ -Cadinene (8,30%), α -Eudesmol (6,75%).En outre, l'huile essentielle de *Populus alba* contient également des quantités minoritaires de divers constituants (tableau 12).

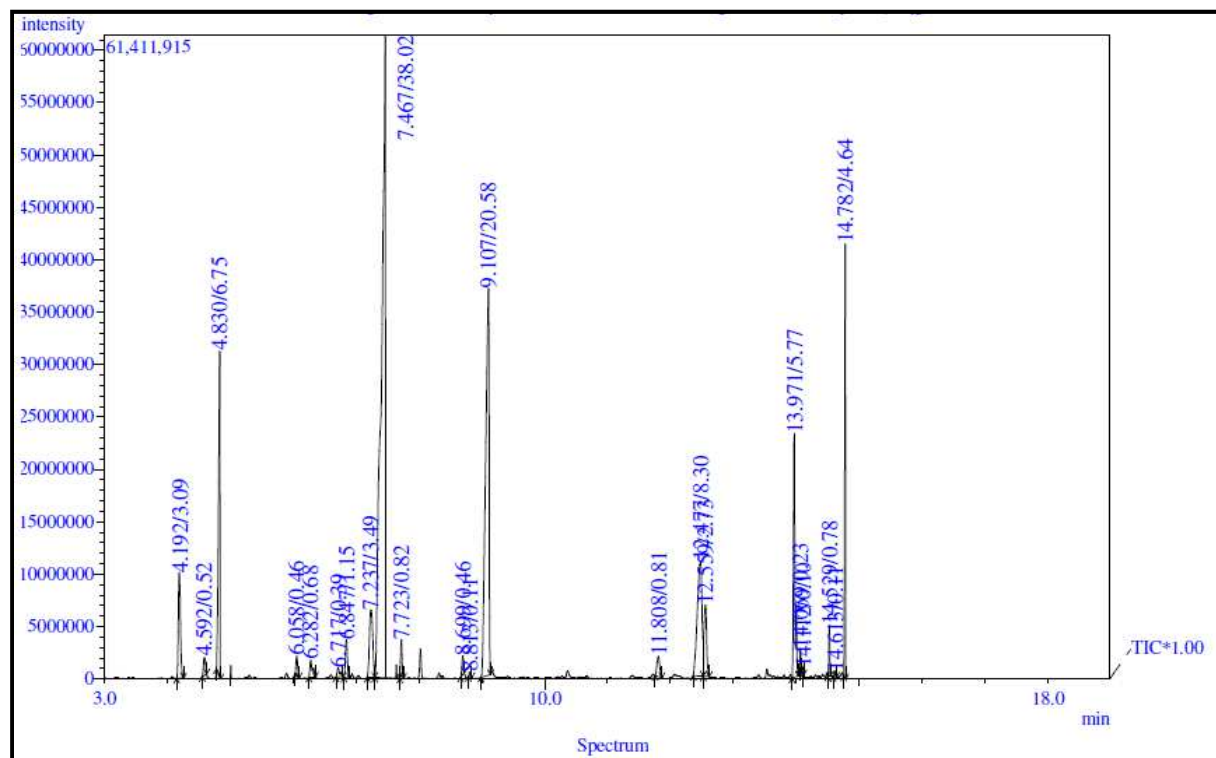


Figure 22 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *Populus alba*.

Tableau 12 : La composition chimique de l'huile essentielle de *Populus alba*.

Pics	Constituants	Temps de rétention (min)	Indice de rétention	Pourcentage (%)
1	δ -Cadinol	4,192	1030	3,09
2	Methyleugenol	4,592	1185	0,52
3	α-Eudesmol	4,830	1292	6,75
4	Linalool	6,058	1478	0,46
5	Docosane	6,282	1519	0,68
6	3-Menthyl-2-phenylethyl butanoicacid	6,717	1575	0,39
7	3-Phenyl-2-propen-1-ol	6,847	1585	1,15
8	(E)-2-Methyl-2-buten-1-ol	7,237	1616	3,49
9	1,8-Cineole	7,467	1633	38,02
10	α -Copaene	7,723	1697	0,82
11	β -Cyclocitral	8,699	1743	0,46
12	β -Caryophyllene	8,813	1792	0,11
13	β-Eudesmol	9,107	1918	20,58
14	Alloaromadendrene	11,808	1934	0,81
15	δ-Cadinene	12,477	1982	8,30
16	α -Muurolene	12,559	1999	2,73
17	α -Copaene-11-ol	13,971	2156	5,77
18	1-Phenyl-2-propen-1-ol	14,069	2189	0,23
19	Decanoicacid	14,112	2230	0,1
20	(E)-2-Methyl-2-buten-1-ol	14,529	2235	0,78
21	Salicylaldehyde	14,613	2252	0,11
22	p-Cymen-8-ol	14,782	2391	4,64

Une observation immédiate du chromatogramme de l'huile essentielle de *Populus alba* a porté sur la présence d'un niveau élevé de 1,8-Cineole dans le groupe des monoterpènes, Eudesmol et le δ -Cadinene qui appartiennent au groupe des sesquiterpènes. Les composés sesquiterpéniques sont des composants mineurs dans les huiles végétales. Ils lui confèrent souvent des caractéristiques essentielles de la saveur (Banthorpe, 1996).

Le α -Eudesmol a été différencié de β -Eudesmol non seulement par les indices de rétention, mais aussi par les spectres de masse (Adams, 1995). Les Eudesmols sont des dérivés de cyclisation de l'hedycaryol au cours du vieillissement de la plante ou pendant le processus d'extraction de l'huile par distillation (Cornwell *et al.*, 2000). Le pourcentage élevé d'Eudesmols dans l'huile pourrait être d'intérêt depuis les travaux de Miyazawa *et al.* (1996) qui ont étudié l'activité antimutagène de l'huile de *Dioscorea japonica*.

La petite fraction de monoterpènes a été dominée par le Linalool (0,46%), β -Cyclocitral (0,46%) et le Méthyle eugénol (0,52%). L'analyse CPG/SM de l'huile essentielle de *Populus alba* a montré l'absence d'aglycone volatil (alcool salicylique). Toutefois, nous avons identifié l'aldéhyde salicylique (0,11%). Ce composé peut provenir de salicine et / ou populin par hydrolyse et oxydation.

La diminution des quantités de matières volatiles est liée à leur volatilité (propriétés physico-chimiques) et la structure botanique des particules qui stockent l'huile essentielle. Bien que les feuilles contiennent beaucoup de composés apolaires (cires et des lipides), une perte significative de substances volatiles peut être notée dans les feuilles séchées de *Populus alba*. Le séchage de la plante à l'air peut affecter la composition qualitative et quantitative du peuplier blanc (Trim, 1955).

2.3. Toxicité aiguë

L'évaluation de la toxicité aiguë consiste à mesurer et enregistrer les différents effets adverses qui sont, immédiatement, apparus après l'administration d'une seule dose de la substance testée. Le test de la toxicité aiguë par voie intra-péritonéale chez le rat peut être utilisé pour satisfaire à des besoins de classification du danger par le biais de la DL₅₀ et pour l'évaluation des risques pour la santé humaine et/ou pour l'environnement (LeBlanc, 2010).

2.3.1. Observations cliniques et survie des rats

Après administration de l'huile de romarin et de peuplier blanc à des doses graduelles, les observations durant une période de l'expérimentation n'ont montré aucuns symptômes cliniques graves de souffrance malgré quelques signes cliniques habituels observés comme l'anorexie, l'hypoactivité. Ils sont réversibles et ont apparus chez les rats pendant une courte durée puis ils ont revenu à son activité. Les résultats des observations des signes cliniques de tous les lots de rats sont reportés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Mortalité des rats en fonction des doses administrées en huiles essentielles.

Lots	Lot 01 (Témoin)	Lot 02	Lot 03	Lot 04	Lot 05
Nombre des rats	10	10	10	10	10
HE de <i>R. officinalis</i> (ml/kg)	0	1	3	5	7
Mortalité	0	0	0	0	0
HE de <i>P. alba</i> (ml/kg)	0	0,4	0,6	0,8	1
Mortalité	0	0	0	0	0

L'absence de signes cliniques graves et de rats morts durant la période d'observation indique que l'huile essentielle de *R. officinalis* et même de *P. alba* administrée par voie intra-péritonéale est dépourvue de toxicité aigüe chez les rats.

2.3.2. Evolution du poids des rats

La variation du poids des rats constitue un paramètre très important. Le suivi régulier des rats durant une période de deux semaines nous a amené à obtenir les valeurs présentées à la figure 23. Une diminution significative ($p < 0,05$) a été notée chez les rats traités par les deux huiles essentielles comparativement aux rats du groupe témoin. Puis, un rétablissement de poids corporel a été enregistré après le 4^{ème} jour qui suit le traitement.

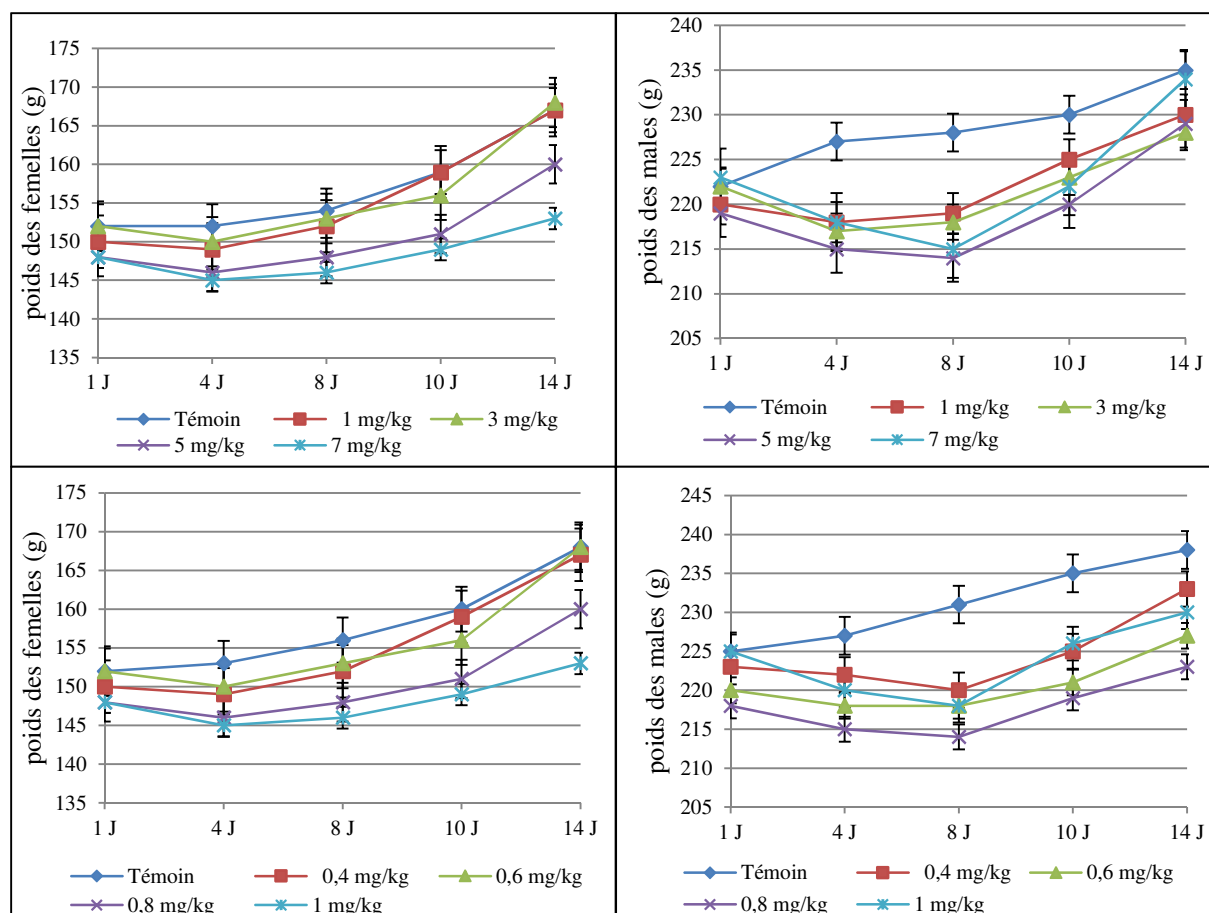


Figure 23 : Evolution du poids des rats traités durant les 14 jours d'observation.

2.4. Test de tolérance cutanée (IP)

Six rats ont été utilisés pour cet essai dont l'objectif est de confirmer la tolérance de la peau quand elle est au contact avec des huiles essentielles. L'action de l'HE de *R. officinalis* et l'HE de *P. alba* sur la peau scarifiée et intacte des rats nous donne les résultats de l'indice d'irritation primaire cutanée présentés dans le tableau 14.

Ce tableau montre les scores de Draize visuels pour l'érythème et l'œdème dans une période de 24h et 72 h après l'application du produit.

Tableau 14 : L'indice d'irritation primaire de l'huile essentielle de *R. officinalis* et de *P. alba*.

Rats mâles N°	<i>R. officinalis</i>								<i>P. alba</i>							
	Peau scarifiée				Peau intacte				Peau scarifiée				Peau intacte			
	24 h		72 h		24 h		72 h		24 h		72 h		24 h		72 h	
	Er	Oe	Er	Oe	Er	Oe	Er	Oe	Er	Oe	Er	Oe	Er	Oe	Er	Oe
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0
4	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	0
5	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
6	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0

Résultats	<i>R. officinalis</i>				<i>P. alba.</i>			
	Peau scarifiée		Peau intacte		Peau scarifiée		Peau intacte	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Erythème	4	2	4	1	6	2	4	2
Œdème	0	0	0	0	1	0	1	0
Total	6		5		9		7	

Oe : œdème

Er : érythème

Donc :

L'indice d'irritation primaire cutanée de l'huile essentielle de *R. officinalis* = $11 / 24 = 0,45$

L'indice d'irritation primaire cutanée de l'huile essentielle de *P. alba* = $16 / 24 = 0,66$

D'après le tableau 14, les phénomènes observés sont uniquement des érythèmes avec un degré variable mais une diminution a été remarquée après 72 h. Alors que les œdèmes sont totalement absents chez les rats traités avec l'HE de *R. officinalis* mais pour l'HE de *P. alba*, une légère apparition des œdèmes durant les 24 h qui seront totalement disparus après 72 h.

L'apparition des érythèmes chez quelques rats peut est due à la pénétration des constituants de l'huile dans l'épiderme. Ainsi, cette apparition est assez remarquée sur les flancs scarifiés qui peut être due à la scarification qui atteint le derme. Il existe certains facteurs qui peuvent influencer sur les phénomènes d'érythème tels que l'affrontement des rats entre eux durant la période d'hébergement et même l'hypersensibilité des rats aux constituants de l'huile.

Selon nos résultats, l'indice d'irritation primaire cutanée de l'huile essentielle de *R. officinalis* est égal à 0,45 alors que l'indice d'irritation primaire cutanée de l'huile essentielle de *P. alba* est égal à 0,66. Et selon l'échelle numérique de Draize, nous avons trouvés que l'HE de *R. officinalis* est non irritante pour la peau ($IP < 0,5$) alors que l'HE de *P. alba* est légèrement irritante ($0,5 < IP < 2$).

L'évaluation du potentiel d'irritation de la peau est essentielle pour assurer la sécurité des personnes en contact avec des substances dans les applications pharmaceutiques.

2.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des huiles essentielles

2.5.1. Inflammation aigue

De nombreux modèles de l'inflammation aiguë peuvent être développés pour la découverte et l'évaluation de nouveaux agents anti-inflammatoires. La variation de l'épaisseur du pied des rats du contrôle à la fin de l'expérience comparée à celle des rats ayant reçu différents traitements sont présentés à la figure 24.

L'administration d'une solution de dextrane à 1% dans la région sub-plantaire de la patte arrière gauche provoque le gonflement dans le pied du rat. L'œdème qui se développe dans la patte du rat après injection de dextrane est le résultat de la médiation de l'histamine et la 5-hydroxytryptamine au cours de la première heure après l'augmentation de la perméabilité vasculaire (DiRosa & Willoughby, 1971). De 2,5-6,0 heures, le médiateur inflammatoire est la prostaglandine (en particulier PGE₂) (en raison de l'induction de la COX-2) qui coïncide avec le thromboxane B₂ (Selibert *et al.*, 1994).

Après traitement avec l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba*, nous avons observé une réduction significative de l'épaisseur de la patte à $5,186 \pm 0,08$ mm et $5,224 \pm 0,17$ mm respectivement. Les résultats ont révélé que les huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* sont apparues efficace pour réduire les réponses induites par le dextrane.

Les huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* ont montré une activité anti-inflammatoire significative à des degrés différents dans le modèle d'inflammation aiguë de la dextrane chez le rat. Des modifications importantes ont été observées entre les rats traités par l'extrait de *R. officinalis*, *P. alba* et Ibuprofène par rapport aux rats du contrôle (eau physiologique) (figure 24). Cependant, le médicament utilisé comme référence, Ibuprofène®, était plus efficace dans la prévention de ces effets. La douleur aiguë peut être soulagée efficacement par les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens qui inhibent la cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2) (Hoogstraate *et al.*, 2003).

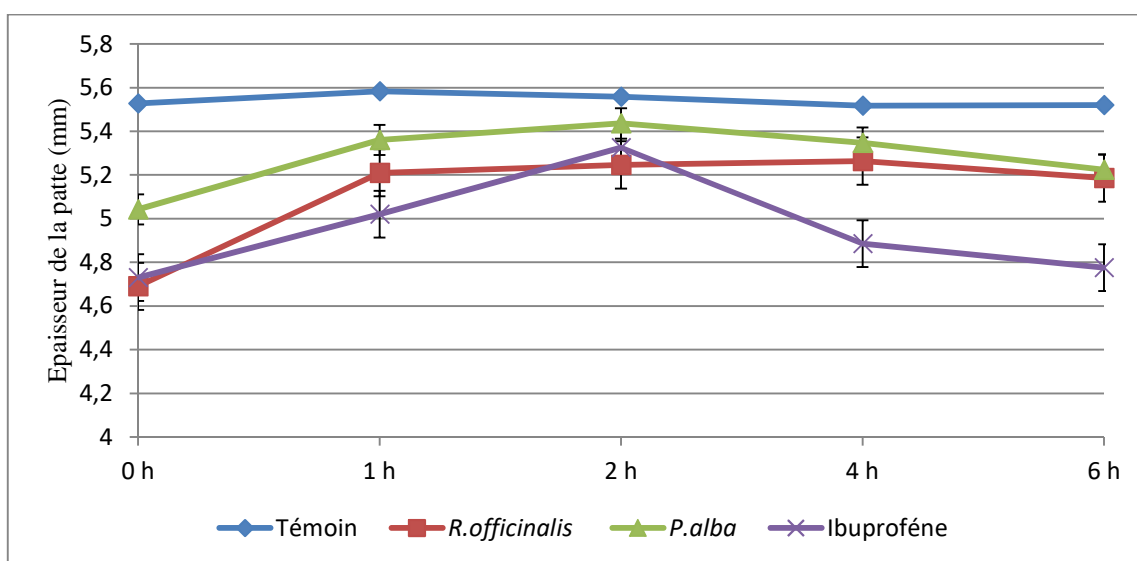


Figure 24 : Evolution de l'épaisseur du pied des rats témoins et traités.

Donc, le mécanisme d'action des extraits étudiés comme anti-inflammatoires implique une réduction de l'ensemble des médiateurs inflammatoires mentionnés ci-dessus (Van Ryn *et al.*, 2000). L'inhibition de l'inflammation a eu lieu au cours des intervalles de temps de l'expérience. Tous les traitements ont produit des réductions de l'inflammation allant de 2,19 à 15,15% (figure 25, planche 2).

Le mécanisme impliqué dans l'effet anti-inflammatoire des extraits peut être liée à un récepteur couplé à la protéine G et / ou d'interférence dans le système de messager intracellulaire phospholipase C / phosphate inositol (Zeilhofer, 2007).

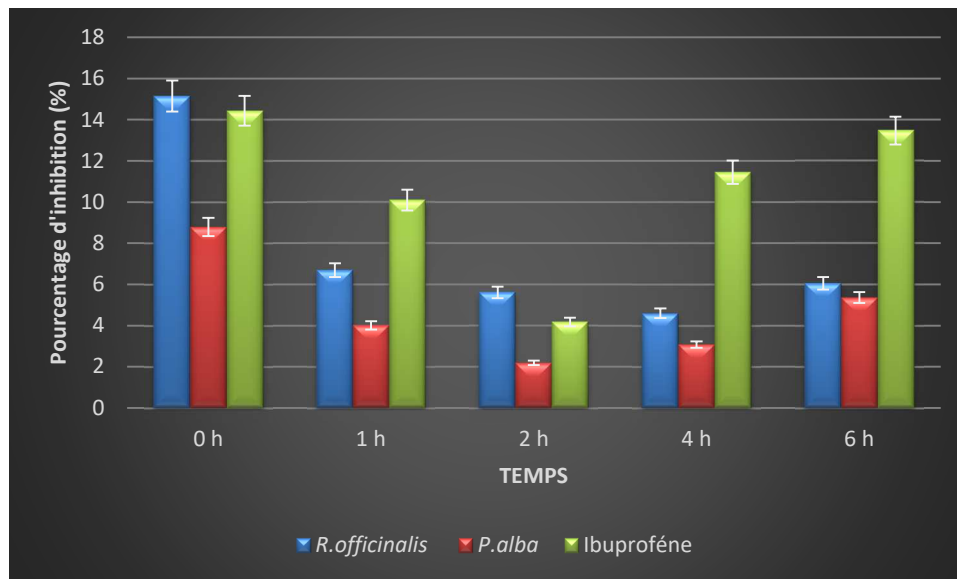


Figure 25 : Pourcentage d'inhibition du gonflement du pied des rats

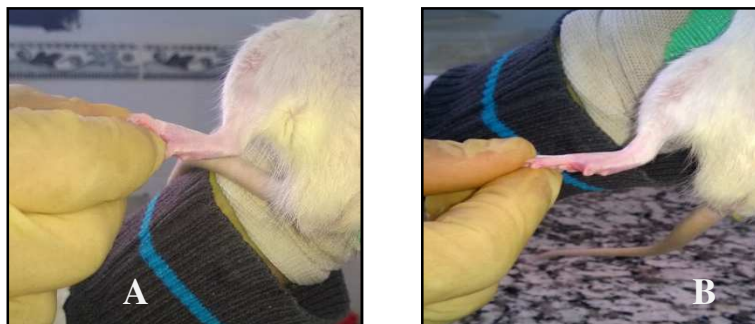


Planche 2 : Aspect de la patte avant (A) et après traitement (B).

2.5.2. Inflammation chronique

2.5.2.1. Évolution du poids corporel des rats

Le suivi régulier du poids corporel des rats normaux témoins et traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba* et Voltum nous a permis d'obtenir les résultats représentés dans la figure 26. Sachant que les rats ont bénéficié de la même nourriture, en libre accès, et ont été pesés sur la même balance.

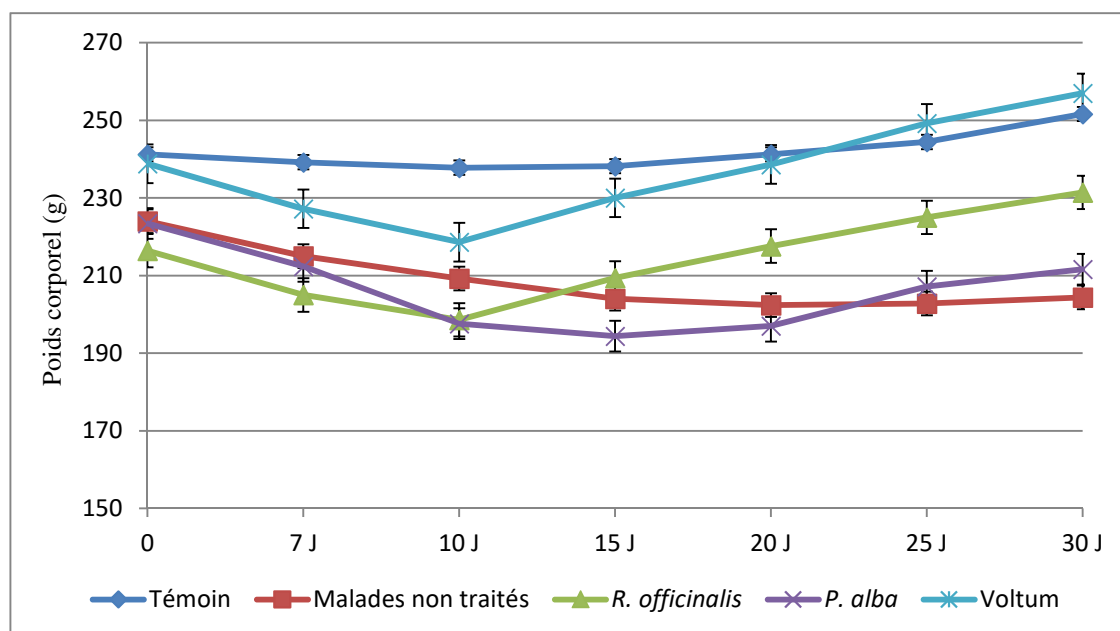


Figure 26 : Evolution du poids corporel chez les rats durant la période d'expérimentation.

Nos résultats montrent une diminution significative du poids corporel chez les rats injectés par le MIA comparativement au lot témoin (figure 27). Ceci pourrait être expliqué par l'effet direct du traumatisme lésionnaire et les facteurs physiopathologiques du processus de l'arthrose. La réduction de poids corporel est utilisée comme indicateur de la détérioration de l'état de santé général du rat. Ainsi, cette réduction du poids peut être associée à la diminution des prises quotidiennes d'aliment après l'administration du MIA (Moreau *et al.*, 2010).

Cette altération de la croissance pondérale des rats est due au processus de défense de l'organisme vis à vis le traumatisme de l'arthrose qui nécessite l'intervention de plusieurs systèmes et fonctions organiques et biologiques telles que la synthèse protéique (ex : collagène). Il y a aussi la division et la croissance de différentes souches cellulaires participantes et/ou impliquées dans le processus physiopathologique post-traumatique (Shah *et al.*, 1989).

Tandis que nous avons enregistré une nette amélioration du poids corporel dans les premiers jours de l'administration de l'huile essentielle de *R. officinalis* et Voltum® comparé aux autres groupes de rats. De même, une faible croissance a été enregistrée chez les rats traités par l'huile essentielle de *P. alba* après 15 jours d'expérimentation.

Par contre, les rats malades non traités restent en diminution du poids expliquée par l'influence continue du MIA dans le corps du rat et plus précisément au niveau de l'articulation.

2.5.2.2. Température rectale des rats

La température est mesurée tous les 5 jours au niveau rectal. Selon les résultats obtenus, nous avons constaté une stabilité des valeurs enregistrées (varient entre 36° et 38°) tout au long de l'expérience.

Quel que soit la nature du traitement, la température reste statiquement identique proche aux valeurs normales ou physiologiques avec des valeurs variant entre $36,4 \pm 0,48$ °C et $38 \pm 0,36$ °C. Les valeurs de la température corporelle (°C) mesurée des rats sont présentées dans la figure 27.

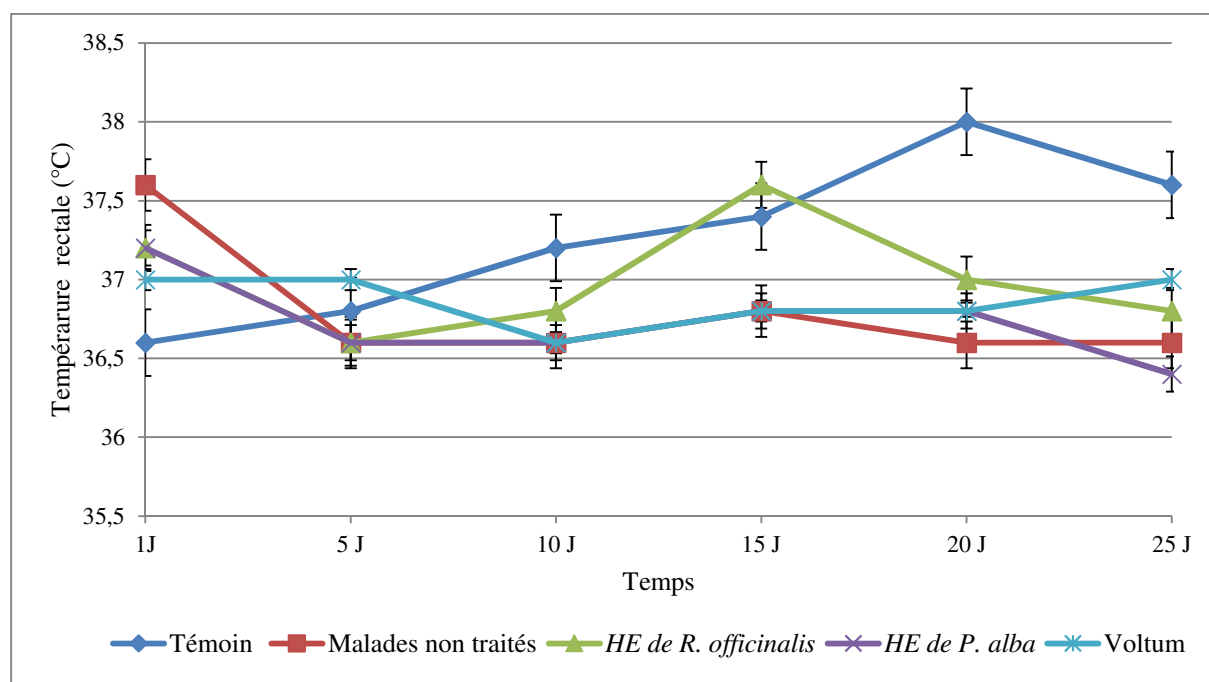


Figure 27 : Evolution de la température rectale chez les rats, selon les différents traitements.

Contrairement au phénomène de décroissance pondéral observé chez les rats durant la première période du traitement, la température rectale des rats n'a pas été modifiée et/ou augmentée chez tous les groupes, quel que soit l'opération et la nature du traitement, malgré le traumatisme lié à la douleur provoquée par l'installation de l'arthrose (figure 27). Ceci peut être expliqué par la résistance de ces animaux aux traumatismes d'une part et à la nature du processus inflammatoire et du système immunitaire moins développé chez le rat par rapport à celui de l'homme d'autre part.

2.5.2.3. Poids des organes

Après 01 mois du traitement, le poids des organes (Cœur, Poumons, Foie, Rate, Reins) a été pris pour suivre et confirmer l'action de différents traitements sur les organes durant la période d'expérimentation. Les valeurs sont présentées dans la figure 28.

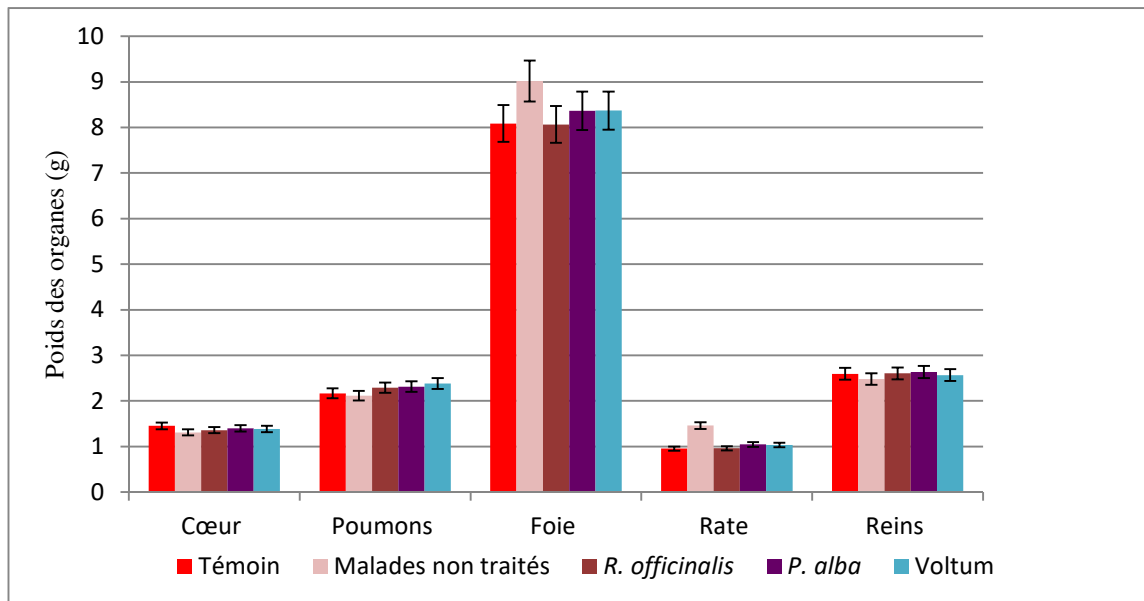


Figure 28 : Le poids des organes des rats normaux témoins et traités.

Le suivi des poids absolus des organes indique que le poids du cœur, poumons et des reins des rats traités et non traités présente des valeurs proches que les valeurs des rats normaux témoins (figure 28). En revanche, notre étude illustre une légère augmentation du poids du foie et de la rate chez les rats malades non traités par rapport aux autres groupes.

2.5.2.4. Evolution des paramètres biochimiques

Au cours de notre expérimentation, nous avons intéressé au suivi de quelques paramètres biochimiques : la CRP ; la phosphatase alcaline (PAL), la calcémie, la créatinine, l'aspartate aminotransférase (ASAT), l'alanine aminotransférase (ALAT) tous les 7 jours après l'injection intramusculaire des différents traitements et de rechercher d'éventuels effets à travers ces paramètres.

- Protéine C-Réactive (CRP)

Les valeurs de la CRP obtenues chez les différents groupes des rats sont présentées dans la figure 29. D'après les résultats obtenus, les valeurs de CRP chez les rats des 04 lots (Malades non traités, *R. officinalis*, *P. alba*, Voltum) étaient remarquablement élevées après 07 jours d'injection intra-articulaire du MIA puisqu'elles dépassent les valeurs de références chez les rats normaux (<300 ng/ml) (Laurell, 1972).

Le niveau de CRP dans le sérum du groupe malade est apparu très élevé par rapport aux autres groupes. Le groupe malade a montré une hausse de $4320 \pm 960 \mu\text{g} / \text{ml}$ après 7 jours de prise du MIA. L'administration de l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba*, Voltum a favorisé une réduction des valeurs de la CRP à $420 \pm 146,96$, $480 \pm 146,96$, $360 \pm 120 \text{ ng} / \text{ml}$ respectivement.

Donc, l'administration de différents traitements (l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba*, Voltum®) par l'injection intramusculaire va diminuer ces valeurs progressivement pour que la CRP prenne sa valeur normale vers le 28^{ème} jour. Nous avons noté que le groupe des rats témoins normaux a présenté une stabilité des valeurs de la CRP tout au long de l'expérimentation.

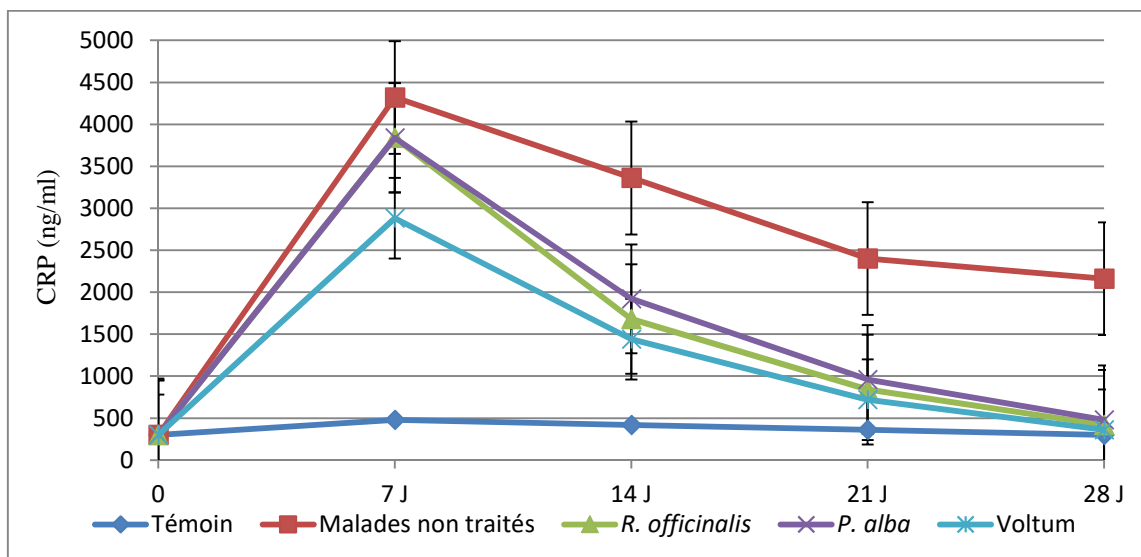


Figure 29 : Variations de la CRP chez les rats témoins et traités.

Compte tenu de la relation connue entre CRP et IL-6, il est suggéré que l'IL-6 produite dans l'articulation touchée peut être en partie responsable des élévations de la CRP systémique observées (Matsumoto *et al.*, 2006). IL-6 est connu pour être le principal régulateur de la production de CRP et peut avoir un rôle dans le processus d'arthrose inflammatoire. IL-6 est connu d'effet direct sur les chondrocytes et stimule les cellules T (Legendre *et al.*, 2003). Un autre stimulus potentiel de la production de CRP par les hépatocytes est l'IL-1. Cette cytokine semble fonctionner en synergie avec l'IL-6 pour promouvoir la production de CRP (Aronson *et al.*, 2006).

Il est démontré que les niveaux élevés de CRP sont associés à la présence des infiltrats inflammatoires synoviaux et que les niveaux de CRP sont en corrélation avec des proportions de lymphocytes T dans la membrane synoviale (Pearle *et al.*, 2003). Le dosage de la C-réactive protéine (CRP) a montré une certaine potentialité à prédire l'évolution de la gonarthrose (Aletaha *et al.*, 2005). Les concentrations sériques de CRP ne reflètent pas seulement l'activité de la maladie (Dawes *et al.*, 1986) mais aussi les destructions articulaires (Young-Min *et al.*, 2007).

- **Phosphatase alcaline (PAL)**

Les valeurs de la phosphatase alcaline (PAL) obtenues chez les différents groupes des rats sont présentées dans la figure 30. Les résultats ont montré une augmentation significative de l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline (PAL) chez les rats recevant le MIA par rapport aux rats témoins et traités. Nous avons noté une variation significative de l'activité de PAL chez les rats traités par le Voltum® comparant aux rats traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba*.

Tandis que nous avons enregistré un rétablissement par une diminution significative de l'activité de PAL chez les groupes traités contrairement au lot malade non traité où la valeur du PAL reste en augmentation.

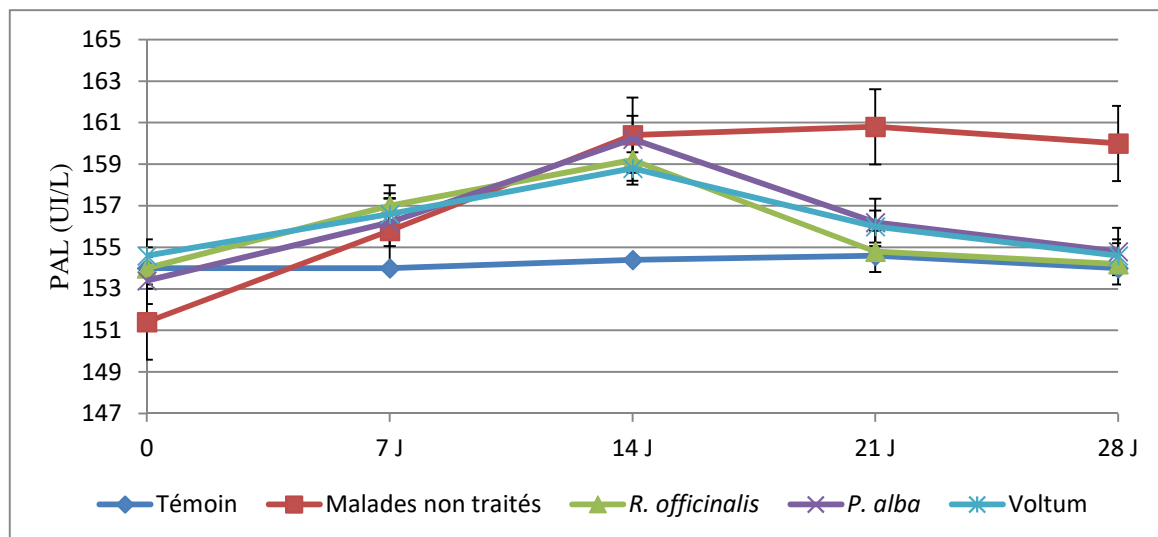


Figure 30 : Variations de la phosphatase alcaline (PAL) chez les rats témoins et traités.

Le rétablissement des valeurs de PAL peut être expliqué par l'action des extraits de l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba* et même le médicament Voltum® avec une certaine différence dans le degré d'influence.

Les phosphatases sont des enzymes critiques dans le système biologique, responsables du métabolisme, de la détoxification, et de la biosynthèse des macromolécules énergétiques pour les différentes fonctions physiologiques. L'interférence avec ces enzymes mène aux perturbations biochimiques, aux lésions tissulaires et la perte de fonction cellulaire. La phosphatase alcaline (PAL) est responsable de la dégradation des esters de phosphate. En plus, elle est utilisée comme indicateur de l'état des voies d'absorption et de transport dans la membrane cellulaire (Eraslan *et al.*, 2009).

- Calcémie

La forme libre du calcium est physiologiquement la forme active. C'est la concentration en calcium ionisé qui est maintenue constante par les mécanismes homéostatiques. L'équilibre homéostatique du calcium est contrôlé et coordonné par des hormones, des facteurs de croissance et des cytokines (Marshall et Bangert, 2005).

D'après les résultats obtenus, les variations observées sur les valeurs du calcium correspondent à une augmentation chez les lots des rats injectés par le MIA après 7 jours de l'administration intra-articulaire. La moyenne de la concentration du calcium chez les rats malades non traités reste aussi en augmentation et supérieure à la valeur de référence obtenue dans la littérature.

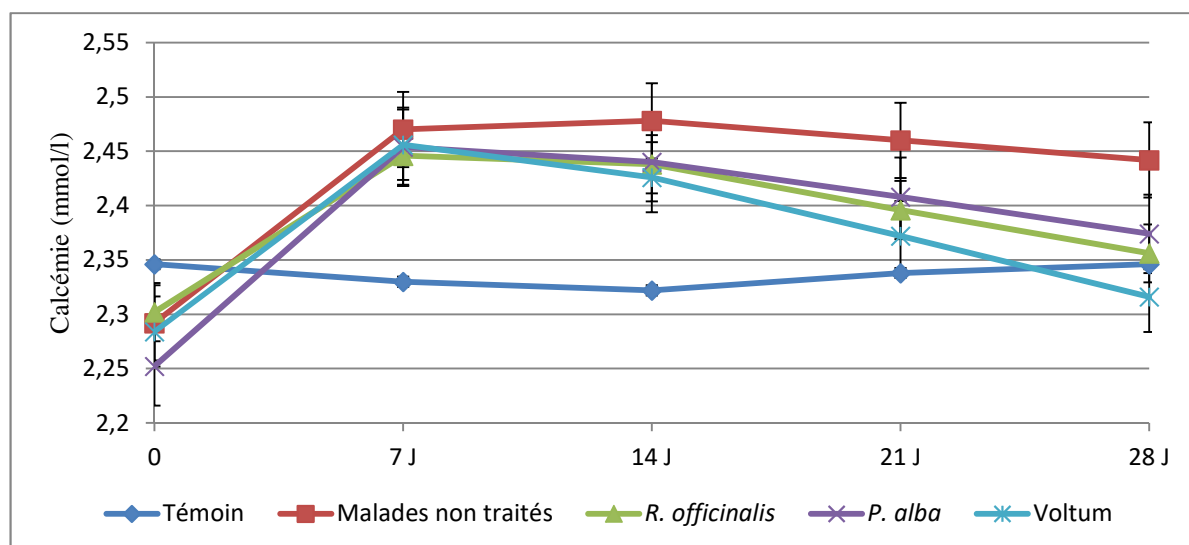


Figure 31 : Variations de la Calcémie chez les rats témoins et traités.

Les causes d'hypercalcémie sont dues à des pathologies malignes souvent associées à des métastases osseuses ou une hyperthyroïdie primaire ou une intoxication à la vitamine D, l'insuffisance rénale, l'hypoparathyroïdie, l'hypomagnésémie (Marshall et Bangert, 2005).

Alors que l'administration des extraits de l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba* et même du médicament Voltum® favorise une diminution de la moyenne de la concentration du calcium (figure 31). Cette diminution est bien observée après une période de 14 jours jusqu'à ce qu'elle atteigne des valeurs qui indiquent l'équilibre homéostatique du calcium à la fin de l'expérimentation. Nous avons noté aussi une stabilité des valeurs du calcium chez les rats témoins au cours de la période de l'expérimentation.

Mühlbauer *et al.*, (2003) ont testé les effets de certaines herbes communes (romarin, thym et sauge) et leur composition d'huiles essentielles et monoterpènes sur la résorption osseuse chez les rats. La résorption osseuse est inhibée par l'addition de 1 g de poudre de feuilles de chaque plante. Ainsi, les huiles essentielles extraites de romarin et la sauge ont des effets inhibiteurs similaires.

Les monoterpènes agissent directement sur les cellules osseuses par inhibition de la voie du mévalonate et la prénylation des petites protéines G telles que Ras, Rac et Rho pour inhiber la résorption osseuse (Mühlbauer *et al.*, 2003).

Nos résultats ont montré que le traitement avec de l'huile essentielle de romarin favorise un niveau de calcium de plasma significativement plus faible. L'effet de l'huile essentielle de romarin sur les niveaux de calcium du plasma a tendance à être dose-dépendante (Faixova *et al.*, 2008).

- Créatinine

Après une semaine d'injection du MIA chez les rats, le dosage biochimique a révélé une augmentation des valeurs de la créatinine chez les rats injectés par rapport aux rats du lot témoin (figure 32). Sur la base de ces résultats, il apparaît que l'injection du MIA a provoqué une légère augmentation de la créatinine chez les rats traités comparés aux témoins (rats intacts). Il peut justifier un risque d'atteinte rénal et une détérioration du métabolisme endogène des rats à traités.

Nos résultats ont aussi démontré le rôle bénéfique de l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba* et du Voltum® sur la fonction rénale. Nous avons enregistré une normalisation des valeurs de la créatinine chez les rats injectés par les huiles essentielles par rapport aux rats du lot témoin. D'après Phillippe (1983), la teneur de la créatinine nous renseigne sur le métabolisme rénal. De plus, ce taux est proportionnel à la masse musculaire de l'organisme (Alain *et al.*, 1980). Lorsqu'une insuffisance rénale s'installe, les taux de la créatinine augmentent. C'est ce que nous avons observé chez les rats malades. En plus, l'augmentation en créatinine indique la capacité diminuée des reins de filtrer ces déchets du sang et de les excréter dans l'urine (Feig *et al.*, 2006).

Ces résultats suggèrent la capacité d'huile essentielle de romarin pour restaurer la fonction d'excrétion rénale. Ceci est en accord avec les résultats de l'étude menée par Sakr et Lamfon (2012), indiquant que l'huile essentielle de romarin pourrait réduire les taux d'urée et de la créatinine dans le sérum des rats.

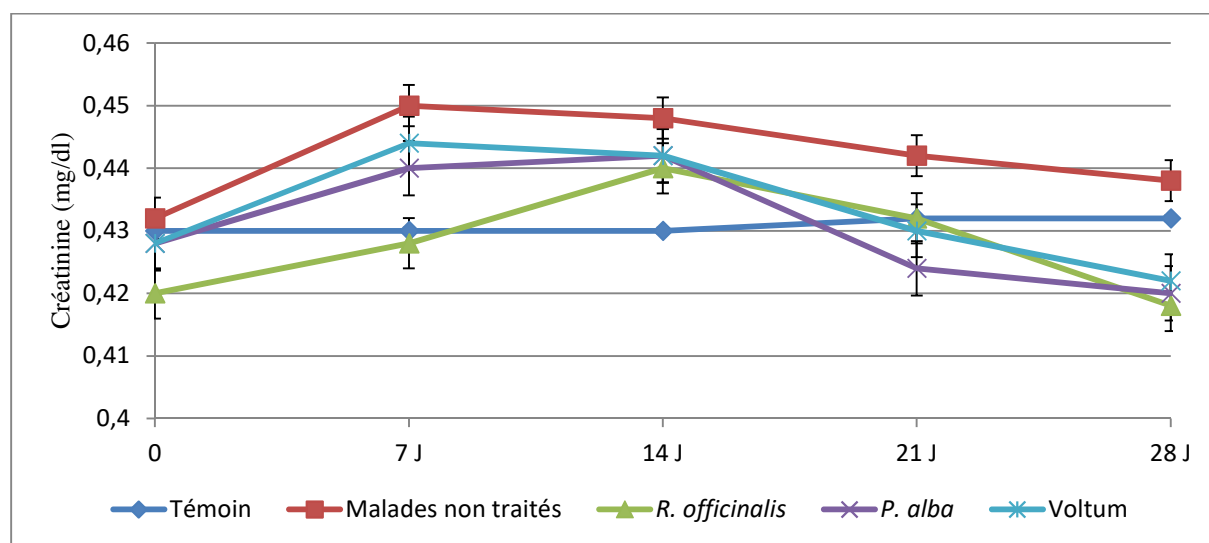


Figure 32 : Variations de la Créatinine chez les rats témoins et traités.

- **Transaminases**

Les transaminases sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules. Elles interviennent dans certaines réactions énergétiques. L'augmentation de leur taux sérique reflète une lésion cellulaire, en particulier au niveau hépatique et de certaines cellules cardiaques (Latha *et al.*, 1998; Kew, 2000).

En outre, le niveau de l'ALAT plasmatique est également utile en indiquant l'existence des affections hépatiques car cette enzyme est présente en grande quantité dans le foie. Elle augmente dans le plasma quand la dégénération ou la destruction cellulaire se produit dans cet organe (Hassoun et Stohs, 1995). De plus, une élévation de concentration des ALAT correspond à une lésion tissulaire active du fait du métabolisme rapide. Le dosage des ALAT couplé à celui des ASAT permet de juger de la gravité de la lésion (Gaschen *et al.*, 1998). L'ASAT reste cependant un bon indicateur de trouble hépatique car sa demi-vie est plus courte que celle de l'ALAT (<1jours versus 2-3 jours) (Fleisher et Wakim, 1963).

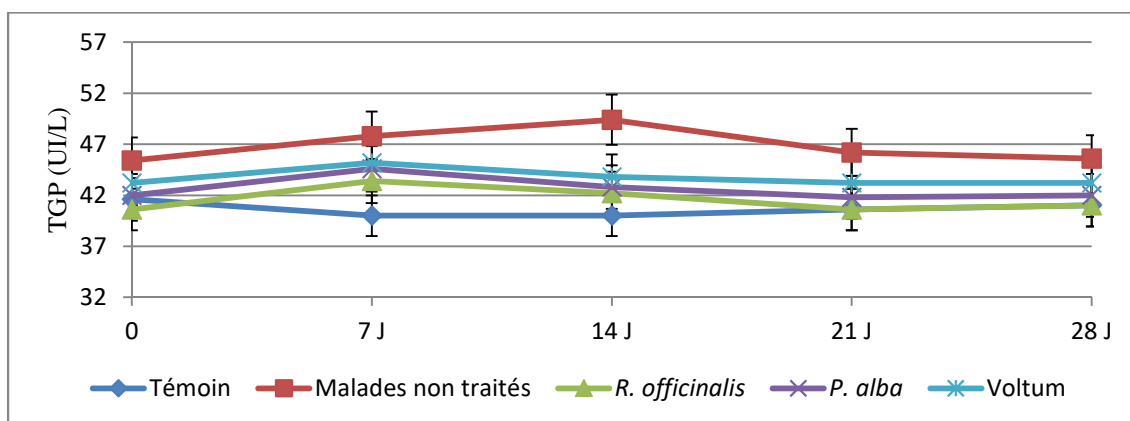


Figure 33 : Variations de la TGP(ALAT) chez les rats témoins et traités.

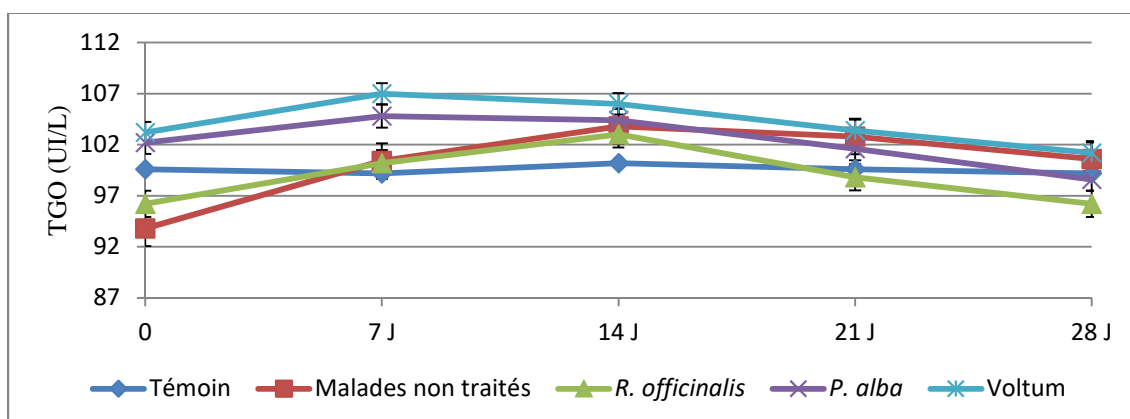


Figure 34 : Variations de la TGO (ASAT) chez les rats témoins et traités.

Suivant les résultats obtenus, l'injection du MIA chez les rats a provoqué une augmentation des enzymes hépatiques (TGO, TGP) qui est probablement liée au stress au cours de la l'installation de l'arthrose (figure 33, 34). Par contre, le traitement des rats par les extraits de l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba* et Voltum® a permis d'enregistrer une diminution de l'activité enzymatique de l'alanine aminotransférase (ALAT) à partir du 7^{ème} jour. Alors que l'activité de l'aspartate aminotransférase (ASAT) a été diminuée vers le 14^{ème} jour pour qu'elles puissent atteindre les valeurs initiales dans le 28^{ème} jour. Mais, nous avons noté une différence de l'activité de l'ALAT et de l'ASAT chez les groupes malades non traités par rapport aux autres groupes. Ainsi, une stabilité des valeurs des transaminases a été remarquée pour le groupe témoin. Les résultats de l'étude réalisée par Sotelo-Félix *et al.*(2002) et Gutiérrez *et al.*,(2010) ont montré que les composés d'huile essentielle de romarin peuvent restaurer l'activité de l'ALAT élevée dans des modèles expérimentaux. Ainsi, les interactions synergiques entre les antioxydants présents dans l'huile essentielle de *R. officinalis* pourraient réduire les niveaux sériques de l'ALAT, PAL et ASAT (Munne-Bosch *et al.*, 1999).

2.5.2.5. Mécanismes anti-inflammatoires de l'HE de *R. officinalis* et *P. alba*

La présence de 1, 8 - cinéole (Eucalyptol) en tant que substance naturelle principale de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* donne beaucoup d'effets anti-inflammatoires et analgésiques. Il est à noter que la composition de 1, 8 – cinéole *in vivo* et dans des conditions *in vitro* est capable d'inhiber la formation de médiateurs de l'inflammation, les prostaglandines, les cytokines et montre des effets analgésiques et anti-inflammatoires considérables (Santos, 2000 ; Ghannadi *et al.*, 2002). Ce monoterpène a présenté des effets pharmacologiques divers, comme relaxant des muscles lisses, anti-inflammatoire, antioxydant et hypotenseur (Santos *et al.*, 2001).

Les monoterpènes (en particulier α -terpineol-) sont analgésique, anti-inflammatoire et relaxant (Kim *et al.*, 2005).

Le camphre possède un effet sur les TRPV1 (vanilloid receptor type-1) et d'autres récepteurs comme le TRPA1 (Transient receptor potential). La particularité du camphre est de désensibiliser les TRPV1 et de bloquer les TRPA1. La saturation et la désensibilisation des TRPV1 entraînent une diminution du recyclage cellulaire. Ils apparaissent de moins en moins à la surface des fibres, provoquant ainsi un effet analgésique (Abegg, 2009).

Le bornéol (alcool monoterpénique) possède aussi une action anti-inflammatoire (Jackson Roberto et da Silva, 2013).

Il faut noter aussi la présence de salicyaldéhyde (0,11%), l'un des dérivés de l'acide acétylsalicylique (aspirine). Il possède un effet dans le blocage des protéines appelées cyclooxygénases (COX) et empêche ainsi la fabrication des prostaglandines. Les prostaglandines sont impliquées, entre autres, dans l'inflammation et l'amplification des signaux de la douleur (Paterson *et al.*, 2008). Xu *et al.*, (1999) ont montré que les dérivés de l'acide salicylique agissent par action anti-inflammatoire en supprimant la transcription des gènes pour la COX.

L'acide salicylique a fait ses preuves comme un succès dans la suppression des réactions inflammatoires aiguës chez les animaux (Cronstein *et al.*, 1999). Abramson *et al.*, (1994) ont montré que l'A. Salicylique inhibe la fonction de neutrophile. Il a été suggéré qu'il était une conséquence de l'induction de la synthèse de l'adénosine (Catania *et al.*, 1991). Les résultats d'une étude récente ont indiqué que l'acide salicylique peut réduire le stress oxydatif associé avec lésion rénale en réduisant les radicaux libres oxygénés et la peroxydation lipidique chez les rats (Randjelovic *et al.*, 2012).

2.5.2.6. Analyse Radiographique

Afin d'observer les modifications de l'articulation du genou, l'examen radiographique a été réalisé sur des rats arthrosiques traités avec l'HE de *R. officinalis* et *P. alba*. Les images du cliché radiographique décrivent les structures osseuses visibles sur une radiographie du profil du genou (figure 35).

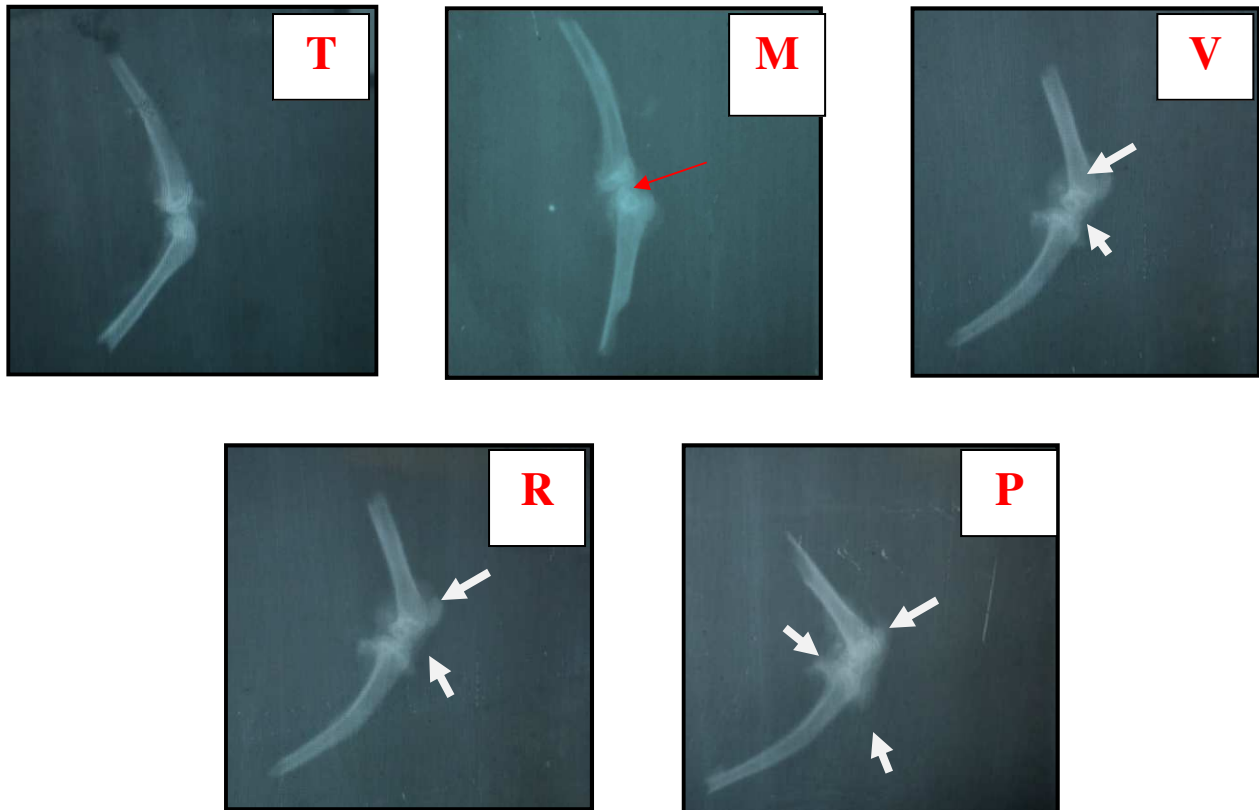


Figure 35 : Radiographie des genoux des rats traités et non traités.

(T : rats normaux témoins, M : rats malades non traités, R : rats traités avec l'HE de *R. officinalis*, P : rats traités avec l'HE de *P. alba*, V : rats traités avec Voltum®)

T : Articulation fémorotibiale avec aspect radiographique normale et d'opacité normale, aspect bicondylien normal.

M : Radiographie de l'articulation fémorotibiale atteinte d'une GONARTHROSE, il faut noter la présence d'une lyse osseuse (flèche rouge), usure du cartilage de l'articulation du genou et instabilité articulaire.

V : Radiographie de l'articulation fémorotibiale d'un rat traité avec le médicament Voltum® : la présence d'une opacité essentiellement concentré au niveau du condyle fémorale correspondant à une cal osseuse cicatricielle, associé à une lyse du cartilage articulaire.

R : Radiographie de l'articulation fémorotibiale d'un rat traité avec HE de *R. officinalis* : présence d'une opacité essentiellement concentré au niveau du condyle fémorale correspondant à une cal osseuse cicatricielle, associé à une lyse du cartilage articulaire.

P : Radiographie de l'articulation fémorotibiale d'un rat traité avec HE de *P. alba* : présence d'une nette opacité diffuse sur toute la surface articulaire et la surface articulaire correspondant à une cal osseuse cicatricielle remplaçant le cartilage osseux.

La lecture consensus des radiographies donne la répartition suivante: rats non arthrosiques n=7 (radiographie normale), rats arthrosiques avec signification douteuse n=5, rats arthrosiques avec modification minimale n=6, rats arthrosiques avec arthrose certaine n=2 et rats arthrosiques avec état évolué d'arthrose n=5.

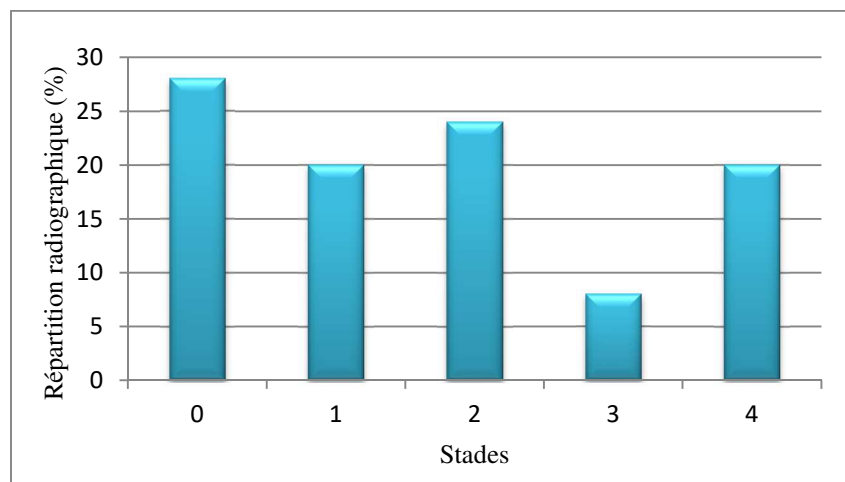


Figure 36 : Répartition radiographique des genoux des rats selon le score de Kellgren et Lawrence.

2.5.2.7. Analyse histopathologique

La présente étude décrit l'efficacité de l'HE de *R. officinalis* et *P. alba* dans un modèle d'arthrose du genou induite par le MIA. Le principal critère retenu pour rendre compte du développement de l'arthrose a été l'apparition de modifications histologiques du cartilage et de l'os sous-chondral. Les données obtenues confirment celles décrites dans la littérature, à savoir que le MIA provoque une nécrose cellulaire dans les zones touchées, une prolifération des chondrocytes en marge des lésions et une perte matricielle en protéoglycanes (Dumond *et al.* 2004).

Il ne suffit pas d'observer les images produites par le microscope. Encore, il faut les interpréter. L'interprétation donne une signification aux images observées, détecte la présence d'une structure, d'une molécule, d'une fonction chimique et permet de les localiser dans la cellule, le tissu, l'organe ou l'organisme. L'interprétation est basée sur des processus de reconnaissance de formes, de contrastes, de couleurs (André *et al.*, 2008).

Dans la présente étude, les résultats histopathologiques du groupe malade non traité ont montré que l'administration du MIA provoque des changements y compris la dégradation du cartilage articulaire, une inflammation synoviale, la destruction de la structure osseuse sous-chondrale dans l'articulation du genou. Chez les rats traités, certains changements dégénératifs incluent la fibrillation superficielle du cartilage articulaire, des fissures verticales se prolongeant dans les zones profondes et la dégénérescence des chondrocytes (figure 37). Ces changements donnent des preuves sur le processus de réparation du cartilage articulaire.

Le groupe témoin injecté par une solution saline n'a présenté aucun changement dans la morphologie histologique du genou (Normal). Le score moyen de lésion histologique calculé était de zéro. Toutes les caractéristiques morphologiques incluses étaient normales dans ce groupe de contrôle. Les résultats histologiques pour ce groupe ont été constitués de la couche de surface intacte, une population normale de chondrocytes, de la morphologie normale des cellules et la matrice continue (figure 37).

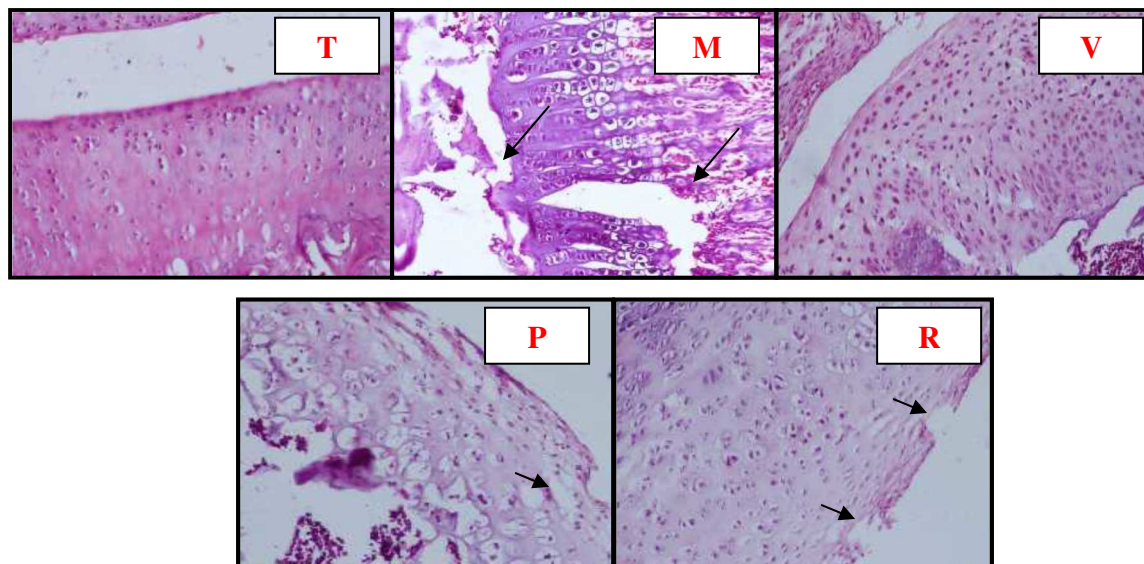


Figure 37 : Images de coupe frontale de l'articulation de genou après coloration HES (x100).

(T : rats normaux, M : rats malades non traités, R : rats traités avec l'HE de *R. officinalis*, P : rats traités avec l'HE de *P. alba*, V : rats traités avec Voltum®).

Le système de notation histopathologique a été développé suivant le score de Mankin. Ce système a été utilisé pour estimer le niveau de l'arthrose clinique chez le rat Wistar après l'injection de Mono-Iodo-acétique par voie intra-articulaire. Les lésions ont été divisées en cinq classes à partir de l'histologie normale vers cartilage endommagé. La division des lésions histologiques dans des classes était comparable avec le modèle du Pritzker *et al.* (2006).

Alors que Hluchy *et al.* (2008) ont utilisé la description pour l'évaluation histopathologique des changements dégénératifs dans le cartilage et les a marqué sur la base de la gravité avec la progression de l'arthrose par rapport au temps. Les lésions histologiques utilisées étaient la perte de la couche superficielle, l'érosion du cartilage, la fibrillation ou fissures, perte de protéoglycanes, désorganisation des chondrocytes, la perte de chondrocytes.

L'analyse histologique des sections de l'articulation du genou traitées par l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* a montré une diminution significative du score de Mankin par rapport au groupe malade non traité (grade arthrose III) (figure 38). Cette preuve était compatible avec de fortes altérations dégénératives articulaires dans les articulations du genou. Tandis que les groupes traités par Voltum® ont révélé des modifications dégénératives articulaires moins sévères (grade arthrose II).

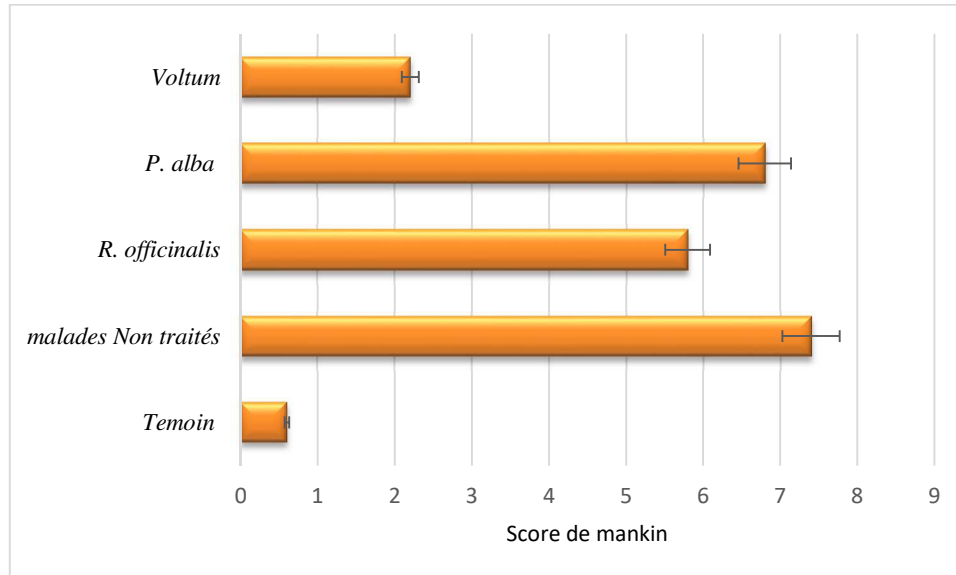
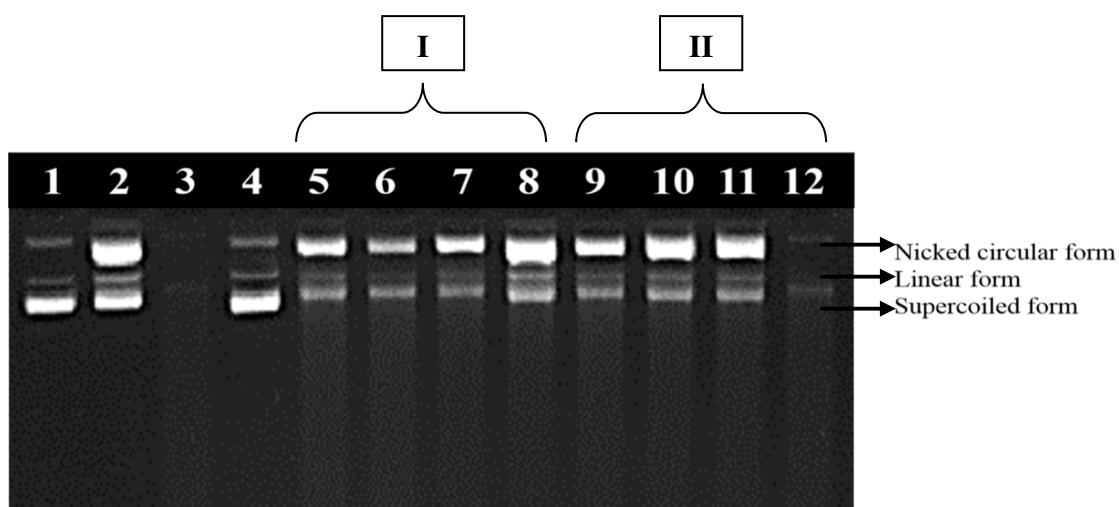


Figure 38 : Score de Mankin obtenu chez les rats témoins et traités.

2.6. Activité protectrice des huiles essentielles contre les dommages de l'ADN

Dans cette partie, nous avons évalué l'activité protectrice de l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* contre les dommages oxydatifs de l'ADN du plasmide pBR322 selon le mode opératoire *in vitro* décrit par Russo *et al.*, (2000) et Lee *et al.*, (2002).

La figure 39 représente le profil électrophorétique de l'ADN du plasmide pBR322 après oxydation par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 2,5 mM / photolyse UV en absence et en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* (25, 50, 100 et 200 $\mu g / ml$).



Ligne 1 : L'ADN non traité

Ligne 2 : L'ADN du plasmide pBR322 + tampon phosphate salin 5 mM

Ligne 3 : L'ADN du plasmide pBR322 irradié

Ligne 4 : Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 2,5 mM

I : L'huile essentielle de *R. Officinalis* (25, 50, 100 et 200 $\mu g / ml$)

II : L'huile essentielle de *P. alba* (25, 50, 100 et 200 $\mu g / ml$)

Figure 39 : Effet protectif de l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* contre l'oxydation de l'ADN du plasmide pBR322 par le peroxyde d'hydrogène / UV

Les radicaux libres peuvent modifier la structure des macromolécules et causer des dommages aux tissus et à la régénération. Par conséquent, ils peuvent jouer un rôle dans la pathogénie de certaines maladies. H_2O_2 est un agent oxydant qui ne dirige pas une quelconque réaction avec de l'ADN. Ce radical passe à travers les membranes et peut entrer dans le noyau. En présence d'ions métalliques tels que le fer et le cuivre, H_2O_2 au cours de la réaction de Fenton peut générer hautement réactif radical hydroxyle (OH^\bullet). Les radicaux hydroxyles attaquent à l'ADN et ont abouti à la rupture des brins d'ADN et de la fragmentation (Yen *et al.*, 2000).

L'ADN du plasmide pBR322 a montré deux bandes par électrophorèse sur gel d'agarose. La bande qui se déplace plus rapidement correspond à la forme native de l'ADN superenroulé et le groupe plus lent était la forme circulaire ouverte. Le rayonnement UV de l'ADN en présence de H₂O₂ a permis le clivage de l'ADN superenroulé en forme linéaire et forme linéaire ouverte.

L'addition de l'huile essentielle de *R. officinalis* (ligne 5-8) et l'huile essentielle de *P. alba* (ligne 9-12) au mélange de réaction de H₂O₂ a présenté une légère réduction dans la formation de l'DNA linéaire (figure 39). Cette réduction est enregistrée dans la ligne 8 qui porte la concentration 200 µg / ml de l'huile essentielle de *R. officinalis*.

Les composés naturels des huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* peuvent influencer sur l'oxydation de l'ADN par un mécanisme simple. Il est expliqué par la trempe des radicaux oxygénés en donnant atome d'hydrogène ou d'électrons conduisant à l'inhibition de la réaction de Fenton. Donc, il pourrait également piéger directement OH⁻ et la protection de l'ADN plasmidique superenroulé (Prakash *et al.*, 2007).

Il a été décrit très récemment que le bornéol, comme composants d'huiles essentielles de romarin, était en mesure de protéger les cellules contre les dommages de l'ADN induite par H₂O₂ chez les rats (Slamenová *et al.*, 2008; Horváthová *et al.*, 2009).

Slamenova *et al.*, (2002) a rapporté que la pré-incubation à long terme (24 h) des cellules V79 de hamster avec 30 µg / ml de romarin a provoqué une diminution significative des lésions de l'ADN. Alors qu'aucune génotoxicité n'a été observée en raison d'autres concentrations de romarin (Slamenova *et al.*, 2002).

Les propriétés antioxydantes de romarin ont été exprimées par de nombreuses études (Horvathova *et al.*, 2010). Le mécanisme antioxydant de l'huile essentielle de romarin est attribué à sa forte activité de piégeage des radicaux libres ainsi que le don d'électrons aux radicaux libres pour créer des espèces moins actives et les inhibant d'attaquer les biomolécules cellulaires comme les protéines et l'ADN (Sakr et Lamfon, 2012).

Donc, l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* présentent une protection contre la scission de l'ADN induite par les radicaux OH⁻ générés à partir de la photolyse UV/H₂O₂ ce qui supprime de la formation linéaire de l'ADN.

**CONCLUSION
GENERALE
ET
PERSPECTIVES**

L'Algérie par sa position géographique abrite une biodiversité exceptionnelle occupée par une importante richesse des Plantes Aromatiques et Médicinales. Le travail présenté dans cette thèse a pour objectif d'exploiter des composants bioactifs d'origine naturelle à partir de deux espèces bien choisies « *Rosmarinus officinalis* et *Populus alba* ». Et même suivre l'efficacité de ses composés dans le traitement d'une maladie sévère affectant la structure osseuse et la stabilité du cartilage articulaire. Comme un second but, nous avons étudié la capacité des huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* pour inhiber les dommages de l'ADN induits par des radicaux libre.

L'absence de signes cliniques de toxicité graves et de rats morts durant la période d'observation indique que l'huile de *R. officinalis* et même de *P. alba* administrée par voie intra-péritonéale est dépourvue de toxicité aigüe chez les rats.

Le test de tolérance cutanée montre que l'huile essentielle de *R. officinalis* est non irritante pour la peau alors que l'huile essentielle de *P. alba* est légèrement irritante.

La détermination de la composition chimique des huiles essentielles de *R. officinalis* et *Populus alba* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) a permis de montrer que l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* sont riches en éléments bioactifs spécifiquement dans le groupe des monoterpènes et sesquiterpènes. Les variations rencontrées dans la composition chimique du point de vue qualitatif et quantitatif de nos échantillons comparés à certains travaux antérieurs peuvent être dues à certains facteurs écologiques, à la partie de la plante utilisée, à l'âge de la plante et la période du cycle végétatif ou même à des facteurs génétiques.

Le modèle d'inflammation expérimentale aiguë et même chronique réalisés a montré que les huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* ont présenté une activité anti-inflammatoire significative à des degrés différents dans le modèle d'inflammation aiguë de la dextrane chez le rat. Le traitement avec l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* a montré une réduction significative de l'épaisseur de la patte. Donc, les huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* sont apparues efficace pour réduire les réponses induites par le dextrane.

Alors que l'étude de l'activité anti-inflammatoire dans le modèle d'induction chronique est basée sur l'injection intra-articulaire unilatérale d'une solution de mono-iodo acétate (MIA) afin de mettre en évidence l'action de nos huiles essentielles contre ce modèle d'arthrose.

D'après les résultats obtenus, les variations observées sur les valeurs des marqueurs biochimiques d'inflammation correspondent à une augmentation chez les lots des rats injectés par le MIA. Mais, le traitement avec l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* a montré un rétablissement des valeurs de marqueurs biochimiques avec une certaine différence dans le degré d'influence.

La lecture consensus de la radiographie des genoux a donné une répartition des rats normaux, et d'autres arthrosiques avec des degrés divers (douteuse, minime et évoluée).

La dernière partie de notre travail a été limitée pour étudier la capacité des huiles essentielles de *R. officinalis* et *P. alba* à inhiber les dommages de l'ADN induits par des radicaux libre. L'addition de l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* au mélange de réaction de H₂O₂ a réduit avec un faible degré la formation de l'ADN linéaire. Donc, l'huile essentielle de *R. officinalis* et *P. alba* peut présenter une protection contre la scission de l'ADN induite par les radicaux OH⁻ générés à partir de la photolyse UV/H₂O₂.

Nos résultats montrent que les huiles essentielles de *R. officinalis* et de *P. alba* testées témoignent des activités anti-inflammatoire et antioxydante *in vivo*. Ces études pourront être approfondies par d'autres :

- 1) Fractionnement et isolement des biomolécules actives contenues dans les huiles essentielles testées par des méthodes plus spécifiques.
- 2) Evaluation des effets biologiques étudiés dans le présent travail sur les molécules isolées.
- 3) Evaluation d'autres effets biologiques *in vitro* comme *in vivo* des huiles essentielles et de leurs composés actifs.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

- **Abegg D., 2009.** Travail de bibliographie : Les termo TRP, p9.
- **Abramson SB., Leszczynska-Piziak J., Clancy RM., Philips M., Weissmann G., 1994.** Inhibition of neutrophil function by aspirin-like drugs (NSAIDS): requirement for assembly of heterotrimeric G proteins in bilayer phospholipid. *Biochem Pharmacol*; 47:563-572. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90189-9](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(94)90189-9).
- **Adam M., Berset C., Kessler M., Hamburger M., 2009.** Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders- A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *J. Ethnopharmacol* 121(3): 343-359.
- **Adams R.P., 1995.** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Illinois.
- **Adam R.P., 2001.** Identification of essential oils by Capillary Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, Allured Publ. Corp., Carol Stream, IL.
- **Adjoungoua A.L., Koffi A., Traore F. et Diafouka F., 2008.** Etude Phytochimique et Toxicologique de *Ziziphus mauritiana*, (*Rhamnaceae*), Une Plante Anti-hypertensive. *Med. Pharm. Afr*, Vol 21,73-82.
- **AFNOR., 1987.** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. P 57.
- **AFNOR., 2005.** Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles Tome 2 – Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles 663 P.
- **Alain B., Bertrand M., Fourestier M., 1980.** Dictionnaire des constantes biologiques et physiques. 5^{ème} édition Maloin : 523.
- **Albu S., Joyce E., Paniwnyk L., Lorimer J.P., Mason T.J., 2004.** Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrasonics Sonochemistry*. 11: 261-265.
- **Aletaha D., Nell VPK., Stamm T., et al., 2005.** Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res*; 7: R796-R806.
- **Almela L., Sanchez-Munoz B., Fernandez-Lopez J. A., Roca M.J, Rabe V., 2006.** Liquid chromatographic- mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatography A*. 1120: 221-229.
- **Altman R. D., et Marcussen K. C., 2001.** Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 44 (11), 2531-2538.

- **André J.M., Catala M., Morère J.J., Escudier E., Katsanis G., Poirier J., 2008.** Histologie : les tissus Niveau PAES 2007 – 2008, Université Pierre et Marie Curie.
- **AOAC., 1984.** Official methods of analysis. 11th Edition William Horvi Washington. D.C.
- **Antman E. M., Bennett J. S., Daugherty A., Furberg C., Roberts H., et Taubert K. A., 2007.** Use of no steroidal anti-inflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 115 (12), 1634-1642.
- **Anwar F., Ali M., Hussain AI. and Shahid M., 2009.** Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal*. 24: 170-176.
- **Arden N. et Nevitt M.C., 2006.** Osteoarthritis: epidemiology. *Best pract res clin Rheumatol*. 20 (1) : p. 3-25.
- **Arnold N., Valentini G., Bellomaria B., Laouer H., 1997.** Comparative study of the essential oils from *Rosmarinus eriocalyx* Jordan & Fourr. From Algeria and *R. officinalis* L. from other countries. *J.essent.Oil Res*. 9: 167-175.
- **Aronson D., Goldberg A., Roguin A., Petcherski S., Rimer D., 2005.** Effect of obesity on the relationship between plasma C-reactive protein and coronary artery stenosis in patients with stable angina. *Atherosclerosis*; 185:137.
- **Arslan D., Musa ozcan M., 2007.** Evaluation of drying methods with respect to drying kinetics, mineral content and color characteristics of rosemary leaves. *Energy Conversion and Management*.
- **Aslam F., Rasool N., Riaz M., Zubair M., Rizwan K., Abbas M., Bukhari T.H., Bukhari I.H., 2011.** Antioxidant, haemolytic activities and GC–MS profiling of *Carissa carandas* roots, *Int. J. Phytomed*.3, 567–578.
- **Atik bekkara F., Bousmaha L., Taleb bendiab S.A., Boti J.B., Casanova J., 2007.** Composition chimique de l’huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l’état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*. 7: 6-11.
- **Audigie C., Figarella J., Zonszaain F., 1978.** Manipulation d’analyse biochimique. Doin (Ed). Paris, 274p.
- **Aumailley M., El Khal A., Knöss N., Tunggal L., 2003.** Laminin 5 processing and its integration into the ECM, *Matrix Biol.*, 22, 49-54.
- **Ayadi S., Jerribi C., Abderrabba M., 2011.** Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* recueillie dans trois régions différentes de la Tunisie. *J. Soc. Alger. Chim*, 21(1), 25-33.

-B-

- **Baba aissa F., 2000.** Encyclopédie des plantes utiles. p : 2-3.
- **Bahorun T., 1997.** Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. Food and agricultural research council, Mauritius. 83-94.
- **Bakirel T., Bakirel U., Ustuner Keles O., Gunes Ulgen S., Yardibi H., 2008.** *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol.* 116: 64-73.
- **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., 2008.** Review MI-Biological effects of essential oil. A review Food and chemical Toxicology; Vol. 46; pp 446-475.
- **Banthrope D.V., 1996.** Terpenoids. In: Mann, J., Davidson, R.S., Hobbs, R.B., Banthrope, D.V., Harborne, J.B. (Eds.), Natural Products. Longman, Essex, pp. 306–327.
- **Bellakhdar J., 1997.** La pharmacopée marocaine traditionnelle. Ibis (Ed). Paris, 764 p.
- **Belaiche P., 1979.** Traité de phytothérapie et d’aromathérapie, Ed. Maloine, p.136.
- **Belcaro G., Cesarone M. R., Dugall M., Pellegrini L., Ledda A., Grossi M. G., Togni S., et Appendino G., 2010.** Efficacy and safety of Meriva (R), a curcumin phosphatidyl choline complex, during extended administration in osteoarthritis patients. *Alternative Medicine Review,* 15(4), 337-344.
- **Beloued A., 1998.** Plantes médicinales d’Algérie. 2^{ème} Edition. Office des publications universitaires (Ed). Alger, 274p.
- **Benhabiles NEH. and Aït Ammar H., 2001.** Comparative study of Algeria’s *Rosmarinus eriocalys* and *Rosmarinus officinalis*. *Perfumer & Flavorist.* 26: 40 – 48.
- **Benhouhou S., 2005.** Institutue agronomique national, Alger (Algérie).
- **Bennadja S., Tlili Ait Kaki Y., Djahoudi A., Hadeff Y. and Chefrour A., 2013.** Antibiotic activity of the essential oil of laurel (*Laurus nobilis L.*) on eight bacterial strains. *Journal of Life Sciences.* 7(8) : 814-819.
- **Bernadet M., 2000.** Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles. Ed. Dangles. In Benzeggouta N., 2005. Etude de l’activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. Mémoire de magister, Université de Constantine, 110 p.
- **Berthiaume M. J. et al., 2005.** Meniscal tear and extrusion are strongly associated with progression of symptomatic knee osteoarthritis as assessed by quantitative magnetic resonance imaging. *Ann Rheum Dis.* 64 (4): p. 556-63.

- **Biswal S. et al., 2002.** Risk factors for progressive cartilage loss in the knee: a longitudinal magnetic resonance imaging study in forty-three patients. *Arthritis Rheum.* 46: p. 2884-92.
- **Bland Y. S. et Ashhurst D.E., 1996.** Changes in the contents of the fibrillar collagens and the expression of their mRNAs in the menisci of the rabbit knee joint during development and ageing. *Journal of molecular histology.* 28 (4): p. 265-274.
- **Bonhomme L., 2009.** Protéome Foliaire et Efficience d'Utilisation de l'Eau chez le Peuplier. Thèse doctorat.
- **Bousbia N., Vian M.A., Ferhat M.A., Petitcolas E., Meklati B.Y., Chemat F., 2008.** Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* 14, 355-362.
- **Bradley J. D., Katz B. P., et Brandt K. D., 2001.** Severity of knee pain does not predict a better response to an anti-inflammatory dose of ibuprofen than to analgesic therapy in patients with osteoarthritis. *Journal of Rheumatology,* 28(5), 1073-1076.
- **Bradley J. D., 2004.** Systemic Analgesics. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2^{ème} éd., p. 243-249). New York: Oxford University Press.
- **Bremness L., 1998.** Les plantes aromatiques et Médicinales. Bordas Editions.
- **Brulé Ch. and Pecout W., 1995.** L'ylang-ylang: un parfum subtil. Grasse, France : Arco Charbot; Paris: V.F. aromatique.
- **Bruneton J., 1987.** Éléments de phytochimie et de pharmacognosie, Ed. Tec, Lavoisier.
- **Bruneton J., 1993.** Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. Edition. Technique et documentaire, 3^{ème} édition. 634 p.
- **Bruneton J., 1999.** « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». Editions Tec & Doc, Paris, éditions médicales internationales, pp : 483-560.
- **Buckwalter J. A. et Mankin H. J., 1998.** "Articular cartilage : tissue design and chondrocyte matrix interactions." *Instr Course Lect* 47, 477-86.
- **Buckwalter J. A. et Mankin H. J., 2005.** Articular cartilage and osteoarthritis. *Instructional course lectures American academy of orthopaedic surgeons.* 54:p. 465.
- **Buckwalter J. A., et Martin J. A., 2006.** Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev,* 58, 150-167.

-C-

- **Catania A., Arnold J., Macaluso A., Hiltz ME., Lipton JM., 1991.** Proc Natl Acad Sci USA; 88:8544-8547. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.19.8544>
- **Celiktas O.Y., Kocabas E.E.H., Bedir E., Sukan F.V., Ozek T., Baser K.H.C., 2007.** Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100, 553-559.
- **Chauvin M., et Beaulieu P., 2005.** Pharmacologie des opioïdes. Dans P. Beaulieu, Pharmacologie de la douleur (p. 39-77). Montréal: Les Presses de l'Université de Montréal.
- **Christenson R.H., 1997.** Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem.*; 30, 8: 573-593.
- **Chun J.S. et al., 2008.** Wnt signaling in cartilage development and degeneration. *BMB Rep.* 41 (7): p. 485-94.
- **Cohen Y., Pradeau D., 1992.** Evaluation de la tolérance cutanée in vivo, l'analyse pratique des médicaments, éditions médicales internationales, MOCLP. 007, version B 10/12/2003, Sidal-CRD. Documents de références.
- **Collinson M.E., 1992.** The early fossil record of the Saliceae. *Proceedings of the Royal Society of Edimburgh* 98, 155-167.
- **Cooper S. A., 1981.** Comparative analgesic efficacies of aspirin and acetaminophen. *Archives of Internal Medicine*, 141(3 Spec No), 282-285.
- **Cornwell C.P., Reddy N., Leach D.N., Wyllie S.G., 2000.** Hydrolysis of hedycaryol: the origin of the Eudesmols in the *Myrtaceae*. *Flav. Fragr. J.* 15, 421–431.
- **Cronstein BN., Montesinos MC., Weissmann G., 1999.** Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NFκB. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96:6377-6381. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.11.6377>
- **Crouzet J., 1998.** Arômes alimentaires. Techniques de l'ingénieur F 4 100, pp : 1 – 18.

-D-

- **Das S. K., 2008.** Osteoarthritis. *Best practice & research clinical Rheumatology*: p. 657-675.
- **Davis M. A., 1991.** Knee osteoarthritis and physical functioning: evidence from the NHANES 1 epidemiologic follow-up study. *J Rheumatol.* 18 (4): p. 591-8.
- **Dawes PT., Fowler PD., Clarke S., et al., 1986.** Rheumatoid arthritis: treatment that controls the C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate reduces radiological progression. *Br J Rheumatol*; 25:44-9.

- **Devasagayam T.P.A., Tilak J.C., Bloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D., 2004.** Free radicals and antioxidants in human health: Status and future prospects, *J. Assoc. Phys. India* 52 () 794–804.
- **Denoix J.M., Audigié M., 2002.** Entités pathologiques générales. in Cours T1 pro équine.
- **Derwich E.H., Benziane Z., Chabir R., Taouil R., 2011.** In vitro antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus Officinalis* grown in Morocco. *Int J Pharm Pharm Sci.* 3(3): 89-95.
- **Dickmann D.I., Kuzovkina J., 2008.** Poplars and willow of the world, with emphasis on silviculturally important species. *In: Isebrands JG, Richardson J (eds) Poplars and willows in the world: meeting the needs of society and the environment.* FAO/IPC, Rome, Italy, 135 p-Chap 2.
- **Dieppe P. A., et Lohmander L. S., 2005.** Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet*, 365(9463), 965-973.
- **Digest R., 1997.** Encyclopédie des plantes médicinales.
- **DiRosa M, Willoughby DA., 1971.** Screens for anti-inflammatory drugs. *J. Pharm. Pharmac.* 23, 297-298.
- **Djeddi S., Bouchenah N., Settar I., Skaltsa HD., 2007.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chem. Natural Comp.* 43(4) : 487-490.
- **Dugo G. et DI Giacomo A., 2002.** Citrus. The genus Citrus. Taylor & Francis Publishing, London. 638 p.
- **Dumond H., Presle P., Pottie S., Pacquelet B., 2004.** "Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis." *Osteoarthritis Cartilage* 12 (4): 284-95.
- **Dumortier D., 2006.** Contribution à l'amélioration de la qualité de l'huile essentielle d'ylang-ylang (*Cananga odorata* (Lamarck) J.D. Hooker et Thomson, variété genuina) des Comores - Mémoire de fin d'étude - Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).
- **Dunham J., Hoedt-Schmidt S., Kalbhen DA., 1993.** Prolonged effect of iodoacetate on articular cartilage and its modification by an anti-rheumatic drug. *Int J Exp Pathol*; 283–9.
- **Durand T., 2009.** Approche protéomique des stress abiotiques chez *Populus tremula* x *P. alba*. Thèse doctorat.

-E-

- **Elayyachy M., El Idrissi A., Hammouti B., 2006.** Corros. Sci. 48, 2470.
- **Elchahat NA., 2000.** Les plantes aromatiques et ses produits pharmaceutiques et agricoles. Edition: la maison arabe, P: 283.
- **Eraslan G., Kanbur M., Silici S., 2009.** Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. Food and Chemical Toxicology. 47: 86-91.

-F-

- **Fahem A., 2007.** "Elastokines et angiogenese : rôle de la MT1-MMP et signalisation intracellulaire médiée par S-GAL ", Thèse de l'Université de Reims Champagne-Ardenne.
- **Fauconnier M-L., 2006.** Huile essentielle d'Ylang-ylang : sa fiche qualité et son suivi de distillation- Exposé pour le GIE Maison des Epices des Comores.
- **Faixova Z., 2008.** Biological effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil (A review) Folia Vet. 52:135–139.
- **Feig D.I., Mazzali M., Kang D.H., Nakagawa T., Price K., Kannelis J., 2006.** Serum uric acid: a risk factor and a target for treatment? *Journal of the American Society of Nephrology*. 17 : S 69-73.
- **Felson D.T., 1998.** An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum.*41 (8): p.1343-55.
- **Felson D. T., 2003.** Epidemiology of Osteoarthritis. Dans K. D. Brandt, M. Doherty & L. S. Lohmander (dir.), *Osteoarthritis* (2e éd., p. 511). Oxford University Press Inc.
- **Fernandes J. C., Martel-Pelletier J. et Pelletier J. P., 2002.** The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*, 39(1-2), 237-246.
- **Fisher N. M., Pendergast D. R., Gresham G. E., et Calkins E., 1991.** Muscle rehabilitation: its effect on muscular and functional performance of patients with knee osteoarthritis. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 72(6), 367- 374.
- **Fleisher G.A. et Wakim K.G. 1963.** The fate of enzymes in body fluids-an experimental study. I. Disappearance rates of glutamic-pyruvic transaminase under various conditions. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 61, 76–85.
- **Fletcher D., 2005.** Pharmacologie des anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Pharmacologie de la douleur* Les Presses de l'Université de Montréal. p. 79-107).
- **Fonseca J.E., Santos M.J., Canhao H., Choy E., 2009.** Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmunity reviews* 8: 538-42.

- **Fortier L. A. et al., 2011.** The role of growth factors in cartilage repair. Clin orthop retal res. 469 (10): p. 2706-15.

-G-

- **Garnero J., 1996.** Huiles essentielles. Techniques de l'ingénieur K345 pp 1-45.
- **Gaschen F., Gaschen L., Seiler G., Welle M., Jaunin V.B., Jmaa D.G., et al. 1998.** Lethal peracute rhabdomyolysis associated with stress and general anesthesia in three dystrophin-deficient cats. *Veterinary Pathology Online*, 35, n° 2, 117–123.
- **Gerhard R., 2002.** Press polytechnique et universitaire romandes, Tec et Doc, France, 291.
- **Gerber E. D., Prim J, Michel B. A., 2000.** Sonographie des Bewegungsapparates. Stuttgart; Thieme Verlag.
- **Ghannadi A, Sajjadi SE, El-Muslemi M., 2002.** Phytochemical investigations on flavonoids and constituents of volatile oil of *Rosmarinus officinalis L.* Persian. *Sci Med J Ahwaz Jundishapur Univ Med Sci*; 34: 33-40.
- **Gibson J. N., White M. D., Chapman V. M., et Strachan R. K., 1992.** Arthroscopic lavage and debridement for osteoarthritis of the knee. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 74(4), 534-537.
- **Glasson S.S. et al., 2010.** The OARSI histopathology initiative – recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage*. 18 Suppl 3: p. S17- 23.
- **Goldring M. B., 2007.** Osteoarthritis. *J Cell Physiol*, 213 (3), 626-634.
- **Gonzalez-Trujano M.E., Pena E.I., Martinez A.L., Moreno J., Guevara-Fefer P., Deciga-Campos M., Lopez-Munoz F.J., 2007.** Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis L.* using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*. 111: 476-482.
- **Greenaway W., English S., May J., Whatley F. R., 1991.** Chemotaxonomy of section Leuce poplars by GC-MS of bud exudates. *Biochem. Syst. Ecol*. 19, 507-518.
- **Grégory C., 1988.** Encyclopédia Universalis, Aolto Anabaptisme, Corpus 1, France S.A.
- **Grzanna R., Lindmark L., et Frondoza C. G., 2005.** Ginger--an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. *J Med Food*, 8(2), 125-132.
- **Guba R., 2001.** Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential. *International Journal of Aromatherapy*, 11, 76-83

- **Guingamp C., Gegout-Pottie P., Philippe L., Terlain B., Netter P., Gillet P., 1997.** Monoiodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose–response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum*; 40:1670–9.
- **Gutiérrez R., Alvarado J.L., Presno M., Pérez-Veyna O., Serrano C.J., Yahuaca P., 2010.** Oxidative stress modulation by *Rosmarinus officinalis* in CCl₄-induced liver cirrhosis. *Phytother Res*, 24:595–601.

-H-

- **Hancock J.T., R. Desikan, S.J. Neill, 2001.** Role of reactive oxygenspecies in cell signaling pathways, *Biochem. Soc. Trans.* 29, 345–350.
- **Hannan M.T. et al., 1990.** Estrogen use and radiographic osteoarthritis of the knee in women. The Framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* 33 (4): p. 525-32.
- **Hassoun E.A., Stohs S.J., 1995.** Comparative studies on oxidative stress as a mechanism for the fetotoxicity of TCDD, endrin and lindane in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Teratol.* 51:186.
- **Hayes D. W., Brower R. L. et John K. J., 2001.** "Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair." *Clin Podiatr Med Surg* 18(1): 35-53.
- **Hedrich H. J., 2000.** History, Strains and Models. Dans G. J. Krinke & N. AG (dir.), *the Laboratory Rat*. London: Academic Press.
- **Heinrich M., Kufer J., Leonti M., Pardo-de-Santayana M., 2006.** Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol.* 107: 157-160.
- **Helmick C.G. et al., 2008.** Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part 1. *Arthritis Rheum.*58 (1): p.15-25.
- **Hluchý S., Švík K., Toman R., Miklóšová T., 2008.** The histological and biochemical changes on experimental osteoarthritis in rabbit knee. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, vol. 41 (1), Timișoara.
- **Hoogstraate J., Andersson L.I., Berge O.G., Jonzon B. and Ojteg G., 2003.** Cox-inhibiting nitric oxide donators (CINODs) - a new paradigm in the treatment of pain and inflammation. *Inflammopharmacology* 11: 423-428.
- **Hordé P., 2014.** Dextrane – Définition. issu de Sante-Médecine : santemedecine.commentcamarche.net.
- **Horvathova E., Slamenova D., Maršalkova L., Šramkova M., & Wsolova L., 2009.** Effects of borneol on the level of DNA damage induced in primary rat hepatocytes and testicular cells by hydrogen peroxide. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 1318–1323.

- **Horvathova E., Slamenova D., Navarova J., 2010.** Administration of rosemary essential oil enhances resistance of rat hepatocytes against DNA-damaging oxidative agents. *Food Chem*; 123:151–6.
- **Hunter D.J. et al., 2007.** Knee alignment does not predict incident osteoarthritis: The Framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.*56 (4): p.1212-8.
- **Hussain AI., 2009.** Characterization and biological activities of essential oils of some species of *Lamiaceae*. Thèse de Doctorat. Pakistan. 257p.

-I-

- **IPCC., 2007.** Climate change 2007: the physical science basis. Summary for policymakers. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.
- **Iserin P., 2001,** Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, Ed. Larousse, p.10-17.
- **ISO 1342: 2000.** Oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), Huile essentielle de romarin (*Rosmarinus officinalis* L.).
- **ISO 709:2001.** Huiles essentielles - Détermination de l'indice d'acide. NF T 75-104 : 1994.

-J-

- **Jackson Roberto G., Da Silva A., 2013.** Borneol, a Bicyclic Monoterpene Alcohol, Reduces Nociceptive Behavior and Inflammatory Response in Mice, *The Scientific World Journal* Volume 2013, Article ID 808460, 5 p.
- **Javier C. et al., 2011.** Adipokines and osteoarthritis: novel molecules involved in the pathogenesis and progression of disease, arthritis.
- **Jean-Claude R., Dominique M., Gérard D., 2008.** Flore forestière française : Région méditerranéenne, Forêt privée française, p. 807.

-K-

- **Kalbhen D. A., 1987.** Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J Rheumatol*, 14 Spec No, 130-131.
- **Kellgren J.H., Lawrence D.M., 1957.** Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis*, 16:494-502.
- **Kew M.C., 2000.** Serum amino transferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet*. 355: 591–592.
- **Kim M. J., Nam E. S., Paik S. I., 2005.** The effects of aromatherapy on pain, depression, and life satisfaction of arthritis patients. *Taehan Kanho Hakhoe Chi*, 35 (1), p186-194.

- **König W.A., Hochmuth D.H., Joulain D., 2001.** Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils., Library of Mass Finder 2.1, Institute of Organic Chemistry, Hamburg, Germany.
- **Koskinen A. et al., 2011.** Leptines enhances MMP-1, MMP-3 and MMP-13 production in human osteoarthritic cartilage and correlates with MMP-1and MMP-3 in synovial fluid from OA patients. *Clin exp Rheumatol.* 29 (1): p. 57-64.
- **Ku J.H. et al., 2009.** Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin exp Rheumatol.* 28(12): p. 1431-5.
- **Kukerja A. K., Ur Rahman L., Shishir Singh K., Anand S., Anju Y. and Khanuja S. P. S., 2007.** Qualitative analysis of essential oil of *Rosmarinus officinalis L.* cultivated in Uttaranchal Hills, India. *Journal of Spices and Aromatic Crops*, Vol. 16 (1) : 55–57
- **Kurkin V.A., 2003.** *Chem. Nat. Compd.*, 39,123.

-L-

- **Laadhar L., Zitouni M., Kalle-Sellami M., Mahjoub M., Sellami S., et Makni S., 2007.** Physiopathology of osteoarthritis. From normal cartilage to osteoarthritic cartilage: risk factors and inflammatory mechanisms]. *Rev Med Interne*, 28(8), 531-536.
- **Labat-Robert J., Bihari-Varga M., Robert L., 1990.** “Extracellular matrix“, p: 386-393.
- **Labat-Robert J., Robert L., 2005.** Introduction: matrix biology in the 21st century. From a static rheological role to a dynamic-signaling function“, *Path Biol.*, 53, 369-371.
- **Lamont LA., Tranquilli WJ., Grimm KA., 2000.** Physiology of pain. *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)*, 30, 703-728.
- **Latha RM., Geentha T., Varalakshmi P., 1998.** Effect of *Vernonia cinerea* Flower extract in adjuvant induced arthritis. *General Pharmacology* 31: 601-606.
- **Laurell C.B., 1972.** Electroimmunoassay. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 29(124), 39.
- **Laurent L., 1991.** Eléments minéraux. In : *Techniques d’analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires*. Volume 4. Lavoisier (Ed). Paris, pp78-98.
- **Laurie G.W., Bing J.T., Kleinman H.K., Hassell J.R., Aumailley M., Martin G.R., Feldmann R.J., 1986.** “Localization of binding sites for laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (type IV) collagen”, *J Mol Biol.*, 189, 205-216.
- **Lawrence R. C. et al., 2008.** Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum.* 58 (1): p. 26-35.
- **LeBlanc G. A., 2010.** Acute toxicity. In: *A Textbook of Modern Toxicology*. 4th ed. John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), 125-236.

- **Lee J.C., Kim H.R., Kim J., Jang Y.S., 2002.** Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. Saboten. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6490–6496.
- **Legendre, F. et al. 2003.** *J Biol Chem*, 278(5) : p. 2903-12
- **Lhuillier A., 2007.** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse.
- **Li C., 2000.** Population differences in water-use efficiency of *Eucalyptus microtheca* seedlings under different watering regimes. *Physiol Plant* 108:134–139.
- **Livesley P. J., Doherty M., Needoff M., et Moulton A., 1991.** Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. *Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 73(6), 922- 926
- **Lograda T., Ramdani M., Chalard P., Figueredo G., 2014.** Characteristics of essential oils of *Rosmarinus officinalis* from eastern Algeria. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine.* 2: 794-807.
- **Lozada C. J., et Altman R. D., 2005.** Management of Osteoarthritis. *A Textbook of Rheumatology* (15e éd. Vol. 2, p. 2257-2276.
- **Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F., 2007.** Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Engineer.* 79,1079-1086.
- **Luna L.G., 1992.** Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts, Gaithersburg, MD: American Histolabs. 767 p.

-M-

- **Maitre P., Fau D., Remy D., 2007.** Epidémiologie et symptomatologie de l'arthrose chez le chien et le chat. L'arthrose chez le chien et le chat. *Nouv. Prat. Vét.*, n°35, 16-18.
- **Mankin H.J., Dorfman H., Lipiello L. and Zarins A., 1971.** Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips II: correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J. Bone Joint Surg Am.* 53(3): 523-537.
- **Marcus D. M., et Suarez-Almazor M. E., 2001.** Is there a role for ginger in the treatment of osteoarthritis? *Arthritis and Rheumatism*, 44(11), 2461-2462.
- **Marshall W.J., Bangert S.K., 2005.** *Clinical Chemistry*, 5 Ed. Elsevier, London, 392p.
- **Mankin H.J. and Buckwalter J.A., 1996.** Restoration of the osteoarthritic joint. *J bone joint Surg Am.* 78 (1) : p. 1-2.
- **Martel-Pelletier J., 1999.** Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 7 (4): p. 371-3.

- **Martel-Pelletier J. et Pelletier J. P., 2010.** Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues. *Eklek Cerrahisi*, 21(1):p.2-14.
- **Matsumoto T., Tsurumoto T., Shindo H., 2006.** Interleukin-6. Levels in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis correlated with the infiltration of inflammatory cells in synovial membrane. *Rheum Int*; 26: 96.
- **McIlwraith C.W., 2002.** Diseases of joints, tendons, ligaments, and related structures, in *Adam's lameness in horses*, T.S. Stashak, Editor, Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia. p. 459-469.
- **Merskey H., Bogduk N., 1994.** Classification of pain. International Association for the Study of Pain task force on taxonomy. 2nd ed. Seattle, 209-214.
- **Michel de Montaigne, 1580.** Les essais.
- **Miladi H., Ben Slama R., Mili D, Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E., 2013.** Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science journal*. Vol.5, No.6, 729-739 doi:10.4236/ns.2013.56090
- **Millogo H., Guisson I. P., Nacoulma O. et Traore A. S., 2005.** Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés. Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon.
- **Minor M. A., 2004.** Physical therapy. Dans K. D. Brandt, M. Lohmander, L.S. (dir.), *Osteoarthritis* (2e éd., p. 299-305). Oxford: Oxford University Press.
- **Miyamoto Y. et al., 2007.** A functional polymorphism in the 5' UTR of GDF5 is associated with susceptibility to OA. *Nat Genet*. 39 (34): p. 529-33.
- **Miyazawa M., Shimamura H., Nakamura S., Kameoka H., 1996.** Antimutagenic activity of (+)- α -eudesmol and paeonol from *Discorea japonica*. *J. Agricultural & Food Chem*. 44, 1647–1650.
- **Möller K., 2008.** La distillation à l'alambic, un art à la portée de tous. Editorial UNICO.152 P.
- **Moreau M., Troncy E., Bichot S., Lussier B., 2010.** Influence of changes in body weight on peak vertical force in osteoarthritic dogs: A possible bias in study outcome. *Vet Surg*. Jan; 39(1): 43-7.
- **Morton D.B., Griffiths P.H.M., 1985.** Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and hypothesis for assessment. *Vet*, 116, 431-436.
- **Moulin J.-P., Pareau D., Rakib M. et Stambouli M., 2002.** Transfert de matière. Extraction liquide – liquide. *Techniques de l'ingénieur J1073*, pp : 1 – 13.

- **Miihlbauer R. C., Lozano A., Palacio S., Reinli A., Felix R., 2003.** Common herbs, essential oils and monoterpenes potently modulate bone metabolism. *Bone*, 32, 372-380.
- **Munne-Bosch S., Schwarz K. and Alegre L., 1999.** Enhanced formation of alpha-tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water stressed rosemary plants. *Plant Physiol.* 121(3):1047-1052.
- **Murray R., 1984.** Aspartate aminotransferase, Alanine aminotransferase, Créatinine. *Clin Chem.* The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton; 1112-1116.
- **Myers S. L., Brandt K. D., Ehlich J. W., Braunstein E. M., Shelbourne K. D., Heck D. A. et Kalasinski L. A., 1990.** Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee. *Journal of Rheumatology*, 17(12), 1662-1669.

-N-

- **Neogi T. et Scholz J., 2009.** Neurobiological Mechanisms of Osteoarthritis Pain and Analgesic Treatment. Dans D. T. Felson & H. G. Schaible (dir.), *Pain in Osteoarthritis* (p. 233-254). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- **Nevitt M.C. et al., 2002.** Very low prevalence of hip osteoarthritis among Chinese elderly in Beijing, China, compared with whites in the United States: the Beijing osteoarthritis study. *Arthritis rheum.* 46 (7) :p. 1773-9.
- **NF T 75-111 (octobre 1982).** Huiles essentielles. Détermination de la densité relative à 20° C. - Méthode de référence (homologuée le 5 septembre 1994).
- **NF T 75-112 (octobre 1977).** Huiles essentielles. Détermination de l'indice de réfraction (homologuée le 5 septembre 1994).
- **NF T 75-113 (juin 1982).** Huiles essentielles. Détermination du pouvoir rotatoire (homologuée le 24 mai 1982).
- **NIST., 2005.** Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH) Gaithersburg, Md, USA: National Institute of Standards and Technology.

-O-

- **OCDE., 2004.** Ligne directrice 428 - Absorption cutanée : méthode in vitro. OCDE, Paris.
- **Oluwatuyi M., Kaatz G. W., Gibbons S., 2004.** Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, London/Detroit, n. 24, p. 3249-3254.
- **Ostergaard K., Andersen C.B., Petersen J., Bendtzen K., Salter D.M., 1999.** Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic joints *Ann Rheum Dis.* 58, (4), 208-13.

-P-

- **Padua L.S., Bunyaphatsara N., Lemmens R.H.M.J., 1999.** Plant Resources of South-East Asia, 12.
- **Paterson J.R., Baxter G., Dreyer J.S., Halket J.M., Flynn R., Lawrence J.R., 2008.** Salicylic Acid sans Aspirin in Animals and Man: Persistence in Fasting and Biosynthesis from Benzoic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11648-11652.
- **Prakash D., Upadhyay G., Singh, B.N., Singh, H.B., 2007.** Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chem.* 104, 783–790.
- **Paris R. R., Moyse H., 1965.** Précis de matière médicale : collection de précis de pharmacie, édition : Masson, Paris, 412 p.
- **Pauli A., 2001.** Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int. J. Aromather.* 126-133.
- **Pearle A.D., et al. 2003.** ORS 49th Annual Meeting. New Orleans.
- **Peng Y., Yuan J., Liu F., Ye J., 2005.** Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 39: 431-437.
- **Peterfy C.G., 2002.** Imaging of the disease process. *Curent Opinion in Rheumatology.* 14: p. 590-596.
- **Pharmacopée Française, 1965.** Ordre National des Pharmaciens, Paris, 1965.
- **Philippe M., 1983.** Physiologie humaine, édition *Flammarion*. Pages : 1002-1010.
- **Pincus T., Koch G. G., Sokka T., Lefkowitz J., Wolfe F., 2001.** A randomized, double blind, crossover clinical trial of diclofenac plus misoprostol versus acetaminophen in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *Arthritis and Rheumatism*, 44(7), 1587-1598.
- **Pinta M., Bourdou B., Rousselet F., 1980.** Spectrophotométrie d'absorption atomique .Masson et Arston (Eds).Paris ,478p.
- **Poletti A., 1988.** Fleurs et plantes médicinales. 2ème Edition. Delachaux & Nestlé (Ed). Paris, 222p.
- **Polgár L., 1979.** Deuterium isotope effects on papain acylation. Evidence for lack of general base catalysis and for enzyme-leaving group interaction. *European Journal of Biochemistry.* 98 (2): 369–374. doi:10.1111/j.1432-1033.1979.tb13196.x. PMID 488108.
- **Poole R., Blake S., Buschmann M., Goldring S., Lavery S., Lockwood S., 2010.** Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18 Suppl 3, S10-16.

- **Prakash D., Singh B.N., Upadhyay G., 2007.** Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). Food. Chem. 102: 1389- 1393.
- **Pritzker K. P., 1994.** Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. Ann Rheum Dis, 53(6), 406-420.
- **Pritzker K.P., Gay S., Timenez S.A., Ostergaard K., Pelletier J.P., 2006.** Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. Osteoarthritis Cart. 14(1): 13-29.

-Q-

- **Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. C.N.R.S. (Ed). Paris, 565p.

-R-

- **Raffa R. B., Stone D. J. et Tallarida R. J., 2000.** Discovery of "self-synergistic" spinal/supraspinal antinociception produced by acetaminophen (paracetamol). Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 295 (1), 291-294.
- **Rains C., et Bryson H. M., 1995.** Topical capsaicin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in post-herpetic neuralgia, diabetic neuropathy and osteoarthritis. Drugs and Aging, 7(4), 317-328.
- **Randjelovic P., Veljkovic S., Stojiljkovic N. et al., 2012.** Salicylic acid attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Scientific World Journal; 2012:390613. <http://dx.doi.org/10.1100/2012/390613>
- **Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Flower R. J., 2007.** Rang and Dale's Pharmacology. (6^e éd.). Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier.
- **Ricard-Blum S., Ruggiero F., 2005.** "The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane", Pathol Biol., 53, 430-442.
- **Ritsner M. S., Gottesman I. I., 2009.** Where do we stand in the quest for neuropsychiatric biomarkers and endophenotypes and what next? Dans M. S. Ritsner (dir.), the Handbook of Neuropsychiatric Biomarkers, Endophenotypes and Genes (p. 274). New York: Springer Science + Business Media B.V.
- **Robert L., 1986.** "Structural glycoproteins", Front Matrix Biol., 11, 1-16.
- **Robert G. 2000.** Les Sens du Parfum. Osman Eroyllles Multimedia. Paris. 224 p.
- **Roiron P., Ali A.A., Guendon J.-L., Carcaillet C. et Terral J.F., 2004.** Preuve de l'indigénat de *Populus alba* L. dans le bassin méditerranéen. C.R. Biologies 327 : 125-132.
- **Rosalki S. et al., 1993.** Clin Chem ; 39/4 : 648-652.

- **Rouabah Y., 2010.** Contribution à une étude quantitative des huiles essentielles dans deux espèces végétales : *Globularia alypum L.* et *Rosmarinus officinalis L.* dans le P.N.B. Mém. Ing. Univ. Batna. 68 P.
- **Russo A., Acquaviva R., Campisi A., Sorrenti V., Di Giacomo C., Vulgate G., 2000.** Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol*; 16:91 – 8.

-S-

- **Sakr S.A., Lamfon H.A., 2012.** Protective effect of rosemary (*Rosmarinus Officinalis*) leaves extract on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in albino rats. *Life Sci J*, 9:779–785.
- **Sandell N. F. L. J., 2008.** Anabolic mediators of cartilage healing in bone and osteoarthritis, ed. F. M. C. F. (eds). Vol. 4, London Springer c2007. 97-108.
- **Sandur S. K., Ichikawa H., Pandey M. K., Kunnumakkara A. B., Sung B., Sethi G., et Aggarwal B. B., 2007.** Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radical Biology and Medicine*, 43(4), 568-580.
- **Santos F.A., Rao VS., 2000.** Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytother Res*; 14(4): 240-4.
- **Santos F.A., Silva R.M., Tomé A.R., Rao V.S., Pompeu M.M., Teixeira M.J., De Freitas L.A., De Souza V.L., 2001.** 1,8-cineole protects against liver failure in an *in-vivo* murine model of endotoxemic shock. *J Pharm Pharmacol*, 53:505–511.
- **Selibert K., Zhang Y., Leahy K., Hauser S., Masferrer J., Perkins W., Lee L., Isakson P., 1994.** Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc.Natl. Acad. Sci., USA*. **91**, 12013.
- **Setton L. A., Elliott D. M., et Mow V. C., 1999.** Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*, 7(1), 2-14.
- **Shah A.H., Qureshi S., Tariq M., and Ageel AM., 1989.** Toxicity studies on six plants used in the Traditional Arab System of Medicine. *Phytotherapy Res*. 3: 25-29.
- **Shakibaei M., John T., Schulze-Tanzil G., Lehmann I., et Mobasheri A., 2007.** Suppression of NF-kappaB activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochemical Pharmacology*, 1434-1445.

- **Sharma L. et al., 1999.** Laxity in healthy and osteoarthritis knees. *Arthritis Rheum.* 42 (5): p. 861-70.
- **Sharma L. et al., 2003.** Quadriceps strength and osteoarthritis progression in malaligned and lax knees. *Ann Intern Med.* 138 (8): p. 613-9.
- **Sharma L., Kapoor D., Issa S., 2006.** Epidemiology of osteoarthritis: an update. *Curr Opin Rheumatol*, 18 (2), 147-156.
- **Singh S., 2007.** From exotic spice to modern drug, *Cell*, 130 (5), 765-768.
- **Slamenova D., Kuboskova K., Horvathova E., Robichova S., 2002.** Rosemary-stimulated reduction of DNA strand breaks and FPG-sensitive sites in mammalian cells treated with H₂O₂ or visible light-excited methylene blue. *Cancer Lett*; 177:145–53.
- **Slamenova D., Horvathova E., Maršalkova L., & Wsolova L., 2008.** Carvacrol given to rats in drinking water reduces the level of DNA lesions induced in freshly isolated hepatocytes and testicular cells by H₂O₂. *Neoplasma*, 55,394–399.
- **Sotelo-Félix J.I., Martínez-Fong D., Muriel P., Santillán R.L., Castillo D., Yahuaca P., 2002.** Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J Ethnopharmacol*, 81:145–154.
- **Soyal D., Jindal A., Singh I., Goyal P.K., 2007.** Modulation of radiation-induced biochemical alterations in mice by rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract. *Phytomedicine*.14: 701-705.
- **Spector A., 2000.** Review: oxidative stress and disease, *J. Ocul. Pharma-col.* 16 193–201.
- **Srikanth V.K. et al., 2005.** A meta-analysis of sex differences prevalence, incidence and severity of osteoarthritis. *Osteoarthritis cartilage.* 13 (9): p. 769-81.
- **Stanton B.J., 2009.** The domestication and conservation of *Populus* genetic resources (Chapter 4a). *In: Poplars and willows in the world: meeting the needs of society and the environment.* Eds. Isebrands J.G. & Richardson J. FAO/IPC (Food and Agricultural Organization of the United Nations / International Poplar Commission), Rome, Italy. 86p.
- **Stein C., Comisel K., Haimerl E., Yassouridis A., Lehrberger K., Herz A. et Peter K., 1991.** Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. *New England Journal of Medicine*, 325(16), 1123-1126.
- **Syversen SW., Gol G.L., Van der Heijde D., 2009.** Cartilage and bone biomarkers in rheumatoid arthritis: prediction of 10-year radiographic progression. *J Rheumatol.*p266-72.

-T-

- **Tahraoui A., Israili Z.H., & Lyoussi B., 2010.** Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 132: 48-55.
- **TELA BOTANICA., 2010.** Association « *Populus alba L.* », sur <http://www.tela-botanica.org>.
- **The Bone and Joint Decade, 2005.** European action towards better musculoskeletal health - A public health strategy to reduce the burden of musculoskeletal conditions (91-975284-0-4). Lund, Sweden: Department of Orthopedics, University Hospital.
- **Therkleson T., 2010.** Ginger compress therapy for adults with osteoarthritis. *Journal of Advanced Nursing*, 66(10), 2225-2233.
- **Thomas K. S., Muir K. R., Doherty M., Jones A. C., O'Reilly S. C., et Bassey E. J., 2002.** Home based exercise program for knee pain and knee osteoarthritis: randomized controlled trial. *BMJ*, 325(7367), 752.
- **Tjolsen A., Lund A., et Hole K., 1991.** Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 193(2), 193-201.
- **Toussirot E., Streit G., Wendling D., 2007.** The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr Med Chem*, 14 (10). P: 95-100.
- **Towheed T. E., et Hochberg M. C., 1997.** A systematic review of randomized controlled trials of pharmacological therapy in osteoarthritis of the hip. *Journal of Rheumatology*, 24 (2), 349-357.
- **Tracey D., Klareskog L., Sasso E.H. et al., 2008.** Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117: 244-79.
- **Trim A.R., 1955.** Glycosides as a general group. In: Peach, K., Tracey, M.V. (Eds.), *Modern Methods of Plant Analysis*, Vol. 2. Springer-Verlag, Berlin, pp. 295–300.

-U-

-V-

- **Vandenberg B., Malghem J., Lecouvet F.E., Maldague B., 2001.** Magnetic Resonance Imaging of epioosteonecrosis. *Semin Musculoskeletal Radiol*; 5:57–67.
- **Van der Rest M., Garrone R., 1990.** "Collagens as multidomain proteins", *Biochimie*, 72, 473-484.
- **Van Ryn Y., Trummlitz G., Pairet M., 2000.** COX-2 selectivity and inflammatory processes. *Current Medicinal Chem.* 7, 1145.
- **Vignon E., 2000.** Structure et métabolisme du cartilage articulaire. *Rhumatologie-Lyon Trévoux-société aixoise de documentation médicale et d'édition.* 52 (6) : p. 6-9.

- **Vrhovski B., Weiss A.S., 1998.** Biochemistry of tropoelastin, Eur J Biochem., 258, 1-18.

-W-

- **Waddell G., 1987.** Volvo award in clinical sciences. A new clinical model for the treatment of low-back pain. Spine, 12(7), 632-644.
- **Wamidh H., Talib A., Mahasneh M., 2010.** Antiproliferative Activity of Plant Extracts Used Against Cancer in Traditional Medicine. Sci Pharm.; 78: 33–45
- **Wang C. P., Hsu H. L., Hung W. C., Yu T. H., Chen Y.H., 2009.** "Increased epicardial adipose tissue (EAT) volume in type 2 diabetes mellitus and association with metabolic syndrome and severity of coronary atherosclerosis." Clin Endocrinol 70(6): 876-82.
- **Wieland H. A., Michaelis M., Kirschbaum B. J., et Rudolphi K. A., 2005.** Osteoarthritis- an untreatable disease. Nat Rev Drug Discov, 4(4), 331-344.
- **Winter C.A., Risley EA., Nuss GW. 1962.** Exp. Bio. Medic. 111, 544-547.
- **Wluka A. E., Wolfe S., Stuckey R. et Cicuttini F. M., 2004.** "How does tibial cartilage volume relate to symptoms in subjects with knee osteoarthritis?" Ann Rheum Dis : 264-8.
- **Woods A., Wang G. et Beier F., 2007.** Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. J Cell Physiol. 213 (1): p. 1-8.

-X-

- **Xu X.M., Sansores-Garcia L., Chen X.M., Matijevic- Aleksic N., Du M., Wu KK., 1999.** Suppression of inducible cyclooxygenases-2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. Proc Natl Acad Sci USA; 96:5292-5297. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.9.5292>

-Y-

- **Yen G.C., Hung Y.L., Hsieh C.L., 2000.** Protective effect of extracts of Mesona procumbens Hemsl. On DNA damage in human lymphocytes exposed to hydrogen peroxide and UV irradiation. Food Chem Toxicol; 38:747–54.
- **Young-Min S., Cawston T., Marshall N., 2007.** Biomarkers predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis and perform well compared with traditional markers. Arthritis Rheum; 56:3236-47.

-Z-

- **Zeilhofer H.U., 2007.** Prostanoids in nociception and pain. Biochem Pharmacol: 165-174.
- **Zeng Q.Y., 2006.** Associated risk factors of knee osteoarthritis: a population survey in Taiyuan, China. Chin Med J (Engl). 119 (18): p. 1522-7.

- **Zhang Y., and Jordan J.M., 2008.** Epidemiology of osteoarthritis. *Rheumatic disease Clinics of North America*. 34 (3): p. 515-529.
- **Zhang Y. et al., 2004.** Association of squatting with increased prevalence of radiographic tibiofemoral knee osteoarthritis: the Beijing osteoarthritis study. *Arthritis Rheum.* 50 (4): p. 1187-92.
- **Zimmermann M., 1983.** Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16:109–110.

ANNEXES

ANNEXE I

Les protocoles du dosage des marqueurs biochimiques étudiés

Dosage de la CRP :

Latex anti-CRP : Suspension aqueuse de particules de latex sensibilisées, Flacon compte-gouttes (1 goutte = 50 µl).

Contrôle positif : Flacon compte-gouttes (1 goutte = 50 µl).

Contrôle négatif : Flacon compte-gouttes (1 goutte = 50 µl).

Cartes : Cartes pour réalisation du test.

Agitateurs : Agitateurs à usage unique pour mélange réactifs-échantillons.

Méthode de dosage :

Ramener les réactifs et les sérums à tester à température ambiante (18-25°C).

Test qualitatif :

Déposer successivement sur la carte :

-1 goutte du contrôle positif

-1 goutte du contrôle négatif

-1 goutte (50 µl) de sérum à tester.

- Placer à côté de chaque dépôt 1 goutte de Latex anti- CRP bien homogénéisé.

- Mélanger les 2 gouttes à l'aide d'un agitateur et les étaler.

- Imprimer à la carte un mouvement de rotation et observer l'apparition éventuelle d'une agglutination en 3 minutes.

Lecture :

Réaction négative : La suspension reste homogène

Réaction positive : agglutination nette en 2 minutes.

La sensibilité du test CRP LATEX étant de 6 mg/l. Les sérums donnant une réaction positive ont une concentration supérieure à 6mg/l de CRP.

Test Semi Quantitatif

Préparer une série de dilutions du sérum à tester en solution de NaCl 8,5 g/l. Répéter le test pour chaque dilution de la même manière que pour le test qualitatif et rechercher la dernière dilution donnant encore une agglutination. La concentration du sérum testé en CRP est estimée en multipliant le titre obtenu par le seuil de sensibilité du test 6mg/l.

Dosage de la phosphatase alcaline (PAL) :**Solution de travail :**

Dissoudre le contenu du réactif 2 avec la solution tampon (réactif 1).

La solution est stable pendant 21 jours de 2 à 8°C ou 5 jours de 15 à 25°C.

Méthode de dosage :

Solution du travail : 1,2 ml

Sérum : 20µl

- Mélanger, et attendre 1 min ;
- lire à 405 nm l'absorbance après 1min, 2min et 3min ;
- Calculer la différence entre les absorbances et la moyenne de la différence par minute ($\Delta A/\text{min}$).
- Le blanc de cette réaction est l'eau distillé

Calcul : $\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{ALP (UI/L)}$

Dosage du calcium :

Réactif 1 : Tampon Alcalin **Réactif 2 :** Complexant crésolphtaléine, 8-Hydroxyquinolène

Réactif 3 : Standard calcium

Solution de travail :

Mélanger 1 volume de réactif R1 avec 1 volume de réactif R2.

Stabilité : 4 heures à 20 - 25°C, 20 heures à 2-8°C

Méthode de dosage :

	Blanc	Standard	Echantillon
Solution du travail (ml)	1	1	1
Standard (µl)		20	
Echantillon (µl)			20

- Mélanger et Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Lire à 570 nm les densités optiques. La coloration est stable 1 heure.

Calcul : $A \text{ échantillon} / A \text{ Etalon} \times 10 = \text{mg/dl de Calcium}$

Dosage de la créatinine :**Réactif 1 :** réactif picrique. **Réactif 2 :** réactif alcalin **Réactif 3 :** Etalon de créatinine 2g/l**Méthode de dosage :****Solution de travail :**

- Mélanger des volumes égaux de réactif 1 et réactif 2.
- Dissoudre le contenu du réactif 2 avec la solution tampon (réactif 1).
- La solution de travail est stable pour 10 jours de 15 à 25°C.

	Blanc	Etalon	Echantillon
Solution du travail (ml)	1	1	1
Etalon (µl)		100	
Echantillon (µl)			100

- Mélanger
- Lire à 492 nm (490-510) l'absorbance (A1) après 30 secondes et après 90 secondes (A2) de sérum
- Calculer : $\Delta A = A2 - A1$

Calcul : ΔA échantillon / ΔA Etalon X 2 = mg/dl de créatinine dans le sérum**Dosages des transaminases :****Transaminase Glutamo-oxalo-acétique (TGO) :****Réactif 1 :** tampon, pH 7.8**Réactif 2 :** substrat (NADH, LDH, MDH, α -cétoglutarate).**Solution de travail :**

Dissoudre le contenu du réactif 2 avec la solution tampon (réactif1).

La solution est stable pendant 21 jours de 2 à 8°C ou 72 heures de 15 à 25°C.

Méthode de dosage :**Solution du travail :** 1ml**Sérum :** 100µl

- Mélanger, et attendre 1 min.
- lire à 340nm l'absorbance après 1min, 2min et 3min.
- Calculer la différence entre les absorbances et la moyenne de la différence par minute
- (ΔA /min).
- Le blanc de cette réaction est l'eau distillé

Calcul : ΔA /min \times 1750 = TGO (UI/L)

Transaminase glutamopyruvique (TGP) :

Réactif 1 : tampon, pH 7.8

Réactif 2 : substrat (NADH, LDH, MDH, α -cétoglutarate).

Solution de travail :

Dissoudre le contenu du réactif 2 avec la solution tampon (réactif1).

La solution est stable pendant 21 jours de 2 à 8°C ou 72 heures de 15 à 25°C.

Méthode de dosage :

Solution du travail : 1ml




Sérum : 100 μ l



- Mélanger, et attendre 1 min.
- lire à 340nm l'absorbance après 1min, 2min et 3min.
- Calculer la différence entre les absorbances et la moyenne de la différence par minute ($\Delta A/\text{min}$).
- Le blanc de cette réaction est l'eau distillé

Calcul : $\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{TGP (UI/L)}$

ANNEXE II

Matériels utilisés dans la radiographie et l'histopathologie



		
Tube radiogène	Bombardeur des cassettes	Développeuse Agfa

	
Cassette d'histologie	Microtome LEICA RM2235

ANNEXE III

La nourriture des rats

Elle est composée d'un mélange standard de : Maïs, soja, sel, acides aminés, phosphate, antioxydants, additionnée de complexe multivitaminée et facteurs de croissance. Elle est conditionnée sous forme de granulées.

Voltum Diclofénac Sodium (75mg/3ml)	Ibuprofène 200 mg
	
Composition	Composition
Diclofénac Sodium.....75 mg Excipients : polyéthylène glycol 400, propylène glycol, éthanol absolu, alcool benzylique, metabisulfite de sodium, edetate de sodium, eau pour injection. Boite contenant 2 ampoules de 3 ml.	Ibuprofène 200 mg

ANNEXE IV

Tableau 15 : Evolution de l'épaisseur du pied des rats témoins et autres traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba* et Ibuprofène.

	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h
Contrôle	5,528 ± 0,07	5,584 ± 0,14	5,558 ± 0,13	5,518 ± 0,11	5,52 ± 0,06
<i>R. officinalis</i>	4,69 ± 0,08	5,21 ± 0,07	5,246 ± 0,07	5,264 ± 0,15	5,186 ± 0,08
<i>P. alba</i>	5,042 ± 0,09	5,36 ± 0,29	5,436 ± 0,28	5,348 ± 0,22	5,224 ± 0,17
Ibuprofène	4,73 ± 0,16	5,02 ± 0,09	5,326 ± 0,36	4,886 ± 0,12	4,776 ± 0,15

Tableau 16 : Pourcentage d'inhibition (%) du gonflement du pied des rats

	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h
<i>R. officinalis</i>	15,15	6,69	5,61	4,6	6,05
<i>P. alba</i>	8,79	4,01	2,19	3,08	5,36
Ibuprofène	14,43	10,1	4,17	11,45	13,47

Tableau 17 : Evolution du poids corporel chez les rats normaux témoins et traités.

	Témoin	Malades non traités	<i>R. officinalis</i>	<i>P. alba</i>	Voltum
0 J	241,2 ± 2,71	224 ± 18,29	216,4±8,61	223,4 ± 6,82	238,8 ± 11,66
7 J	237,6 ± 8,45	215 ± 18,84	205±10,62	212,4 ± 10,87	227,2 ± 9,78
10 J	234,8 ± 11,47	209,2 ± 17,90	198,6±9,62	197,6 ± 14,97	218,6 ± 13,12
15 J	234,2 ± 13,15	204 ± 16,07	209,4±6,68	194,4 ± 18,46	230 ± 11,20
20 J	235,2 ± 18,36	202,4 ± 15,64	217,6±8,16	197 ± 23,36	238,6 ± 12,83
25 J	246,4 ± 21,63	202,8 ± 18,10	225±8,78	207,2 ± 24,56	249,2 ± 12,60
30 J	253,6 ± 20,96	204,4 ± 16,46	231,4±9,39	211,6 ± 24,43	257 ± 14,07

Tableau 18 : Evolution de la température rectale (°C) des rats pendant la période du traitement.

Temps	Témoin	Malades non traités	<i>R. officinalis</i>	<i>P. alba</i>	Voltum
1 ^{er} J	36,6 ± 0,48	37,6 ± 0,48	37,2 ± 0,74	37,2 ± 0,74	37 ± 0,63
5 ^{ème} J	36,8 ± 0,74	36,6 ± 0,8	36,6 ± 0,48	36,6 ± 0,8	37 ± 0,89
10 ^{ème} J	37,2 ± 0,74	36,6 ± 0,8	36,8 ± 0,74	36,6 ± 0,8	36,6 ± 0,48
15 ^{ème} J	37,4 ± 0,48	36,8 ± 0,74	37,6 ± 0,48	36,8 ± 0,4	36,8 ± 0,74
20 ^{ème} J	38 ± 0,63	36,6 ± 0,48	37 ± 0,63	36,8 ± 0,74	36,8 ± 0,4
25 ^{ème} J	37,6 ± 0,48	36,6 ± 0,48	36,8 ± 0,4	36,4 ± 0,48	37 ± 00

Tableau 19 : Le poids des organes des rats normaux témoins et traités.

	Cœur	Poumons	Foie	Rate	Reins
Témoin	1,454 ± 0,04	2,165 ± 0,006	8,086 ± 0,15	0,954 ± 0,02	2,596 ± 0,03
Malades non traités	1,31 ± 0,04	2,117 ± 0,03	9,016 ± 0,38	1,460 ± 0,39	2,480 ± 0,11
<i>R. officinalis</i>	1,36 ± 0,02	2,290 ± 0,05	8,065 ± 0,08	0,961 ± 0,05	2,605 ± 0,02
<i>P. alba</i>	1,39 ± 0,05	2,312 ± 0,097	8,365 ± 0,14	1,044 ± 0,12	2,634 ± 0,10
Voltum	1,382 ± 0,02	2,380 ± 0,07	8,369 ± 0,41	1,033 ± 0,07	2,566 ± 0,22

Tableau 20 : Valeurs de la CRP chez les rats témoins et traités pendant 28 jours.

	Témoin	Malades non traités	<i>R. officinalis</i>	<i>P. alba</i>	Voltum
0 J	300	300	300	300	300
7 J	480 ± 146,96	4320 ± 960	3840 ± 1175,75	3840 ± 1175,75	2880 ± 960
14 J	420 ± 146,96	3360 ± 1175,75	1680 ± 587,87	1920 ± 587,87	1440 ± 480
21 J	360 ± 120	2400 ± 1314,53	840 ± 293,93	960 ± 293,93	720 ± 240
28 J	300	2160 ± 1399,42	420 ± 146,96	480 ± 146,96	360 ± 120

Tableau 21 : Valeurs de la phosphatase alcaline (PAL) chez les rats témoins et traités pendant 28 jours.

	Témoin	Malades non traités	<i>R. officinalis</i>	<i>P. alba</i>	Voltum
0 J	154 ± 0,63	151,4 ± 1,49	154 ± 0,89	153,4 ± 1,2	154,6 ± 1,01
7 J	154 ± 0,63	155,8 ± 0,74	157 ± 1,41	156,2 ± 0,74	156,6 ± 1,01
14 J	154,4 ± 1,01	160,4 ± 3,82	159,2 ± 3,37	160,2 ± 2,13	158,8 ± 1,32
21 J	154,6 ± 0,48	160,8 ± 4,70	154,8 ± 1,16	156,2 ± 1,93	156 ± 1,41
28 J	154 ± 0,63	160 ± 5,17	154,2 ± 0,748	154,8 ± 0,748	154,6 ± 0,48

Tableau 22 : Valeurs de la Calcémie chez les rats témoins et rats traités pendant 28 jours.

	Témoin	Malades non traités	<i>R. officinalis</i>	<i>P. alba</i>	Voltum
0 J	2,346 ± 0,028	2,292 ± 0,007	2,302 ± 0,007	2,252 ± 0,053	2,284 ± 0,016
7 J	2,33 ± 0,016	2,47 ± 0,008	2,446 ± 0,022	2,454 ± 0,028	2,456 ± 0,022
14 J	2,322 ± 0,014	2,478 ± 0,016	2,438 ± 0,019	2,44 ± 0,027	2,426 ± 0,025
21 J	2,338 ± 0,019	2,46 ± 0,023	2,396 ± 0,013	2,408 ± 0,013	2,372 ± 0,036
28 J	2,346 ± 0,012	2,442 ± 0,022	2,356 ± 0,013	2,374 ± 0,017	2,316 ± 0,027

Tableau 23 : Valeurs de la Créatinine chez les rats témoins et rats traités pendant 28 jours.

	Témoin	Malades non traités	<i>R. officinalis</i>	<i>P. alba</i>	Voltum
0 J	0,43 ± 0,014	0,432 ± 0,013	0,42 ± 0,006	0,428 ± 0,011	0,428 ± 0,009
7 J	0,43 ± 0,008	0,45 ± 0,016	0,428 ± 0,004	0,44 ± 0,012	0,444 ± 0,008
14 J	0,43 ± 0,006	0,448 ± 0,007	0,44 ± 0,012	0,442 ± 0,007	0,442 ± 0,007
21 J	0,432 ± 0,007	0,442 ± 0,011	0,432 ± 0,014	0,424 ± 0,008	0,43 ± 0,006
28 J	0,432 ± 0,011	0,438 ± 0,013	0,418 ± 0,009	0,42±0,010	0,422 ± 0,007

Tableau 24 : Valeurs de la TGP (ALAT) chez les rats témoins et traités pendant 28 jours.

	Témoin	Malades non traités	<i>R. officinalis</i>	<i>P. alba</i>	Voltum
0 J	41,6 ± 2,24	45,4 ± 2,15	40,6 ± 2,15	42 ± 3,40	43,2 ± 3,37
7 J	40 ± 2,28	47,8 ± 2,78	43,4 ± 1,35	44,6 ± 3,2	45,2 ± 3,18
14 J	40 ± 1,41	49,4 ± 2,33	42,2 ± 1,32	42,8 ± 2,92	43,8 ± 3,24
21 J	40,6 ± 1,2	46,2 ± 3,31	40,6 ± 1,35	41,8 ± 1,93	43,2 ± 2,71
28 J	41 ± 1,78	45,6 ± 1,95	41 ± 1,67	42 ± 2,36	43,2 ± 2,03

Tableau 25 : Valeurs de la TGO (ASAT) chez les rats témoins et rats traités pendant 28 jours.

	Témoin	Malades non traités	<i>R. officinalis</i>	<i>P. alba</i>	Voltum
0 J	99,6 ± 8,16	93,8 ± 5,84	96,2 ± 5,84	102,2 ± 4,74	103,2 ± 7,85
7 J	99,2 ± 6,73	100,4 ± 8,49	100,2 ± 6,55	104,8 ± 4,26	107 ± 7,26
14 J	100,2 ± 6,85	103,8 ± 9,1	103 ± 6,95	104,4 ± 3,44	106 ± 6,63
21 J	99,6 ± 5,98	102,8 ± 9,62	98,8 ± 9,23	101,6 ± 4,75	103,4 ± 5,27
28 J	99,2 ± 7,11	100,6 ± 8,73	96,2 ± 6,17	98,6 ± 3,2	101,2 ± 6,11

Tableau 26 : Répartition radiographique des genoux des rats selon le score de Kellgren et Lawrence

Stades	0	1	2	3	4
Nombre des rats	7	5	6	2	5
%	28	20	24	8	20

Tableau 27 : Score de Mankin obtenu chez les rats témoins et traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba* et Voltum

Groupes	Témoin	Induits Non traités	<i>R. officinalis</i>	<i>P. alba</i>	Voltum
Score de Mankin	0,6 ± 0,48	7,4 ± 1,49	5,8 ± 0,74	6,8 ± 0,74	2,2 ± 0,4

ANNEXE V

Analyse statistique

Evolution du poids des rats traités durant les 14 jours d'observation

ANALYSE DE VARIANCE (<i>R. officinalis</i> / femelles)						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	280,96	4	70,24	1,85134423	0,15863448	2,8660814
A l'intérieur des groupes	758,8	20	37,94			
Total	1039,76	24				
ANALYSE DE VARIANCE (<i>P. alba</i> / femelles)						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	319,36	4	79,84	2,08786611	0,12041152	2,8660814
A l'intérieur des groupes	764,8	20	38,24			
Total	1084,16	24				
ANALYSE DE VARIANCE (<i>R. officinalis</i> / males)						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	223,36	4	55,84	1,80711974	0,16707972	2,8660814
A l'intérieur des groupes	618	20	30,9			
Total	841,36	24				
ANALYSE DE VARIANCE (<i>P. alba</i> / males)						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	501,36	4	125,34	6,02017291	0,00238914	2,8660814
A l'intérieur des groupes	416,4	20	20,82			
Total	917,76	24				

Evolution de l'épaisseur du pied des rats témoins et autres traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba* et Ibuprofène

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,3493408	4	0,0873352	1,11961698	0,38396624	3,05556828
A l'intérieur des groupes	1,170068	15	0,07800453			
Total	1,5194088	19				

Evolution du poids corporel chez les rats durant la période d'expérimentation

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	7275,54743	4	1818,88686	17,1448916	2,0336E-07	2,68962757
A l'intérieur des groupes	3182,67429	30	106,089143			
Total	10458,2217	34				

Evolution de la température rectale chez les rats selon les différents traitements

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1,06666667	4	0,26666667	2,03252033	0,12044666	2,75871047
A l'intérieur des groupes	3,28	25	0,1312			
Total	4,34666667	29				

Le poids des organes des rats normaux témoins et traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba* et *Voltum*

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	179,293241	4	44,8233103	1067,04629	5,3347E-23	2,8660814
A l'intérieur des groupes	0,84013806	20	0,0420069			
Total	180,133379	24				

Variations de la CRP chez les rats témoins et traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba*. et *Voltum*®.

Tableau récapitulatif de l'ANOVA						
Source des variations	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F de Fisher	Prob. Critique	Fthé0.05
Traitement	4	11807424	2951856	1,93004425	0,1446806	2,8660814
Erreur	20	30588480	1529424			
Total	24	42395904				

Variations de la phosphatase alcaline (PAL) chez les rats témoins et traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba*. et Voltum®.

Tableau récapitulatif de l'ANOVA						
Source des variations	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrées	F de Fisher	Prob. Critique	Fthé0.05
Traitement	4	30,64	7,66	1,24108879	0,32550745	2,8660814
Erreur	20	123,44	6,172			
Total	24	154,08				

Variations de la Calcémie chez les rats témoins et traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba*. et Voltum®.

Tableau récapitulatif de l'ANOVA						
Source des variations	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrées	F de Fisher	Prob. Critique	Fthé0.05
Traitement	4	0,02200896	0,00550224	1,28362666	0,30965022	2,8660814
Erreur	20	0,0857296	0,00428648			
Total	24	0,10773856				

Variations de la Créatinine chez les rats témoins et traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba*. et Voltum®.

Tableau récapitulatif de l'ANOVA						
Source des variations	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrées	F de Fisher	Prob. Critique	Fthé0.05
Traitement	4	0,00059904	0,00014976	2,33707865	0,09040548	2,8660814
Erreur	20	0,0012816	6,408E-05			
Total	24	0,00188064				

Variations de la TGP (ALAT) chez les rats témoins et rats traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba*. et Voltum®.

Tableau récapitulatif de l'ANOVA						
Source des variations	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrées	F de Fisher	Prob. Critique	Fthé0.05
Traitement	4	116,5344	29,1336	21,0259815	6,2181E-07	2,8660814
Erreur	20	27,712	1,3856			
Total	24	144,2464				

Variations de la TGO (ASAT) chez les rats témoins et traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba*. et Voltum®.

Tableau récapitulatif de l'ANOVA						
Source des variations	ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrées	F de Fisher	Prob. Critique	Fthé0.05
Traitement	4	94,032	23,508	3,33049983	0,0303237	2,8660814
Erreur	20	141,168	7,0584			
Total	24	235,2				

Score de Mankin obtenu chez les rats témoins et traités par l'huile essentielle de *R. officinalis*, *P. alba* et Voltum®.

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	149,2	4	37,3	37,3	1,254E-07	3,05556828
A l'intérieur des groupes	15	15	1			
Total	164,2	19				

**PUBLICATION
INTERNATIONALE**

Effect of Essential Oils of *Rosmarinus Officinalis* and *Populus Alba* in Biomarkers Level in Osteoarthritis Experimental Model

BELKHODJA Hamza^{a*}, MEDDAH Boumediene^b, TIR TOUIL Aicha^c SONNET Pascal^d

^{a, b, c} Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety, Faculty SNV, University of Mascara, Algeria

^d Laboratory of glucides- Team Thera.- FRE-CNRS 3517, Faculty of Pharmacy, University of Picardie, Amiens, France

Received: January 17 2016
Accepted: March 12, 2016

ABSTRACT

Our work aims to study the effect of essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Populus alba* in biomarkers level in osteoarthritis experimental model. The induction of osteoarthritis in an experimental model was carried out by unilateral intra-articular injection of a mono-iodo acetate solution. It was followed by the treatment was given by using doses of the essential oils. The evaluation of biomarkers level was obtained. The results showed a significant difference in the concentrations of biochemical markers between the groups of treated and untreated rats. The essential oil of *Rosmarinus officinalis*, *Populus alba* may be useful against the osteoarthritis pathology.

KEYWORDS: Essential oils; *Rosmarinus officinalis*; *Populus alba*; Osteoarthritis; biomarkers.

1. INTRODUCTION

Natural products are of great interest for the various sectors such as cosmetics, pharmaceuticals, food and industry [1]. Currently, the World Health Organization (WHO) estimates that about 80% of people use traditional herbal because the plants were able to demonstrate effectiveness. In addition, side effects induced by the drugs concerned users who turn to less aggressive care for the body [2, 3]. Indeed, several of the medicinal plants grown worldwide are well known for their essential oil (EO) which are aromatic, antimicrobial and possess curative potential against different disease states including osteoarthritis (OA) and other inflammatory conditions [4, 5, 6]. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) and *Populus alba* L. (Salicaceae) were selected for the present study [7].

Both the plants are rich source of essential oil (EO) and commonly used in traditional system of medicine against inflammatory diseases and other ailments [8, 9]. Nevertheless, phenolic glycosides (salicin and populin) and essential oil of *P. alba* (white poplar) were reported earlier to possess anti-rheumatic properties [10]. The essential oil of *R. officinalis* (rosemary) showed profound antiproliferative, antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities [11, 12]. The stability of essential oil and their use in food safety might lead to some serious questions [13]. Interestingly, the EO of *Cymbopogon citratus* and *R. officinalis* demonstrated antimicrobial effect against carbapenems resistant *Klebsiella pneumonia* strains [14].

Basically, OA is a musculoskeletal disease affecting bone structure and stability of the articular cartilage [15, 16]. It is often classified under joint diseases which results from a complex system of mechanical, biological, biochemical or molecular interactions [17]. The degeneration of joint cartilage originating from the destruction of the extracellular matrix of chondrocytes despite the repair with targeting the recovery of the homeostatic balance between synthesis and degradation of matrix components [18]. This degeneration is the cause of the onset of fibrillation, cracks and ulceration. Although cartilage degradation is a characteristic of osteoarthritis, the inflammation of the synovial membrane also significantly participates in the pathology installation [18, 19].

Keeping in view the use of essential oil and other natural remedies used in the folk medicine of Algeria and elsewhere, the present study aims to exploit natural bioactive components from well-chosen plants Rosemary and white poplar. In the present study, initially the organoleptic properties of EO of Rosemary and white poplar were evaluated. In the next step, the effect of treatment on OA induced experimental animals was investigated and the results are presented in current communication.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material:

The aerial parts including leaves and flowers of two selected plant species namely: Rosemary and white poplar were investigated. The plants were collected in the Mascara region during the month of April-May

*Correspondent author: BELKHODJA Hamza, Laboratory of Bioconversion, Microbiology Engineering and Health Safety, Faculty SNV, University of Mascara, Algeria. Email: hamzabelkhodja@yahoo.fr, Phone: 00213794608611

2013. They are identified by the botanist of the Department of Biology, Mascara University (ALGERIA) where the voucher specimens were kept on record.

2.2. The experimental animals:

Wistar rats supplied by the biological laboratory of the University of Mascara were used in all experiments. The animals were randomly assigned to different control and treatment groups and housed in cages, with water and food ad libitum. The animals were kept under standard conditions of temperature 20 ± 1 °C, and 12-hour light/12-hour dark cycle. Adequate measures were taken to minimize pain or discomfort of the animals, and all experimental procedures were performed in accordance with the ethical guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).

2.3. Extraction of essential oil (EO):

The extraction of essential oils was carried out by hydrodistillation using Clevenger apparatus. Leaves and flowers (100 g each) were boiled separately. When the temperature stabilized, the distillates in each case were collected in Erlenmeyer collector. Then, sodium chloride was added to the distillates which were stirred until dissolved. An appropriate sized separating funnel was used to achieve three successive washings (10, 10 and 20 ml) with cyclohexane. After agitation, the organic phase was recovered and dried with anhydrous sodium sulfate. The solvent was removed by rotary evaporator and pure essential oil was obtained. The yield was calculated in each case and the EO fractions were stored at +4 °C.

2.4. Organoleptic characters:

According to AFNOR NF ISO 280: 1999, essential oils must respond to analytical characteristics that are established by international committees of experts. To know the quality of the EO of *R. officinalis* and *P. alba*, standard organoleptic tests like color and odor were performed [20].

2.5. Acute toxicity test:

Acute toxicity was estimated by adopting the procedure of Tahraoui *et al.*, (2010) [21]. To assess the acute toxic effects of the EO and the lethal dose LD₅₀ was calculated using albino rats (5 rats in each group) of either sex which were kept segregated in different cages. The average weight of female rats used was 150 ± 5 g whereas average weight of male rat was 220 ± 8 g. The rats were distributed in five groups: each group with 10 rats; 5 males and 5 females. The animals in each group received a single dose (i.p. injection) of 0.4 – 1 mg/kg of the EO obtained from each plant while the control received 9% NaCl. After administration of the EO, the rats were monitored for different signs of toxicity and death during the first, 6th and 24 hours. All signs and symptoms were compared with the control group.

2.6. The anti-inflammatory activity of essential oils:

2.6.1. Preparation of rats:

The operations were conducted in accordance with the Welfare of Animal protocol, excluding any stress and nervousness which might interfere with the results. A total of 25 male Wistar rats weighing 190 - 260 g were used in the present study to evaluate the activity of essential oils (EO) extracted from Rosemary and White Poplar.

OA disorder was created by using mono-iodo acetate (MIA). The rats were placed in five cages, with free access to a standard food (corn, soy, salt, amino acid, phosphate, antioxidants, multivitamin and growth factors) and water. The experiments were initiated after acclimatization of animals. The experimental groups were as follows: Group 1 (untreated normal rats), Group 2 (vehicle), Group 3 (MIA induced+ treatment with EO of Rosemary), Group 4 :(MIA induced rats + treated with EO of white poplar), Group 5 :(MIA induced rats + treated with Voltum).

All experimental procedures were performed in accordance with the ethical guidelines of the Council Directive of the European Communities 86/609 / EEC. For the induction of osteoarthritis, the rats were anesthetized with isoflurane [22].

2.6.2. Induction of osteoarthritis:

The choice of the model of OA turned to unilateral intra-articular injection of MIA (0.3 mg) solution prepared in saline. Under anesthesia, the femorotibial joint was immobilized and a needle was inserted inside of the articular capsule through the patellar ligament. In all cases, MIA was dissolved in water and administered (50 µl) to each rat. In control group, the left knee was injected with physiological saline water. The basal readings were established with a group of rats that were injected with saline in their knees [23]. MIA is known to disrupt glycolysis by inhibiting the activity of dehydrogenase glyceraldehyde 3-phosphate enzyme, resulting in a decrease in metabolic synthesis of cells and optionally lead to necrosis [24].

2.6.3. Treatment:

The development of a treatment must be considered that the signs and symptoms vary according to the affected joint and by stage of disease progression [25]. When the condition is already present, the therapies are directed to symptoms such as pain, instability, joint weakness and decreased function of the joint. The NSAIDs are the most common analgesics to treat pain associated with osteoarthritis [26]. To highlight the effect of EO against this model of osteoarthritis, treatment given to induced rats consists of a dose of 50 µl of each EO (Rosemary and White Poplar). The control group was treated with a standard NSAID drug Voltum (Diclofenac).

The drug dose was given via muscular route with an interval of 2 days to avoid any adverse drug reactions of Voltum.

2.6.4. Body weight of rats:

The body weight of rats was measured using a Sartorius balance (BP 610, precision: 0.01 g). Taking the body weight of the rats was carried out 7 days after the MIA injection. Then, the growth of rats was monitored every fifth day during treatment period with EO and Voltum.

2.6.5. Determination of biomarkers:

The blood samples were collected in tubes (containing EDTA anticoagulant) done on 7th day after treatment. The blood samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 min. and thus obtained serum were stored at -20 °C until determination of the biochemical parameters which could act as biomarkers for inflammation. The selected parameters were as follows: the C-reactive protein; alkaline phosphatase (ALP), serum calcium, creatinine, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) [27].

2.7. Statistical analysis:

The values are expressed as mean ± SEM (standard error of mean). The results of different tests were analyzed by ANOVA single factor for multiple comparisons. The P values less than 0.05 (p < 0.05) are considered as statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Extraction yields:

The EO contents, obtained from the aerial parts (leaves + flowers) were found to be: 1.29 ± 0.3% for the Rosemary and 0.9 ± 0.08% for white poplar. It is worth mentioning that EO contents were found to vary depending on different factors described by earlier researchers [28, 29, 30].

3.2. Organoleptic characters:

The organoleptic properties such as appearance, color and smells were used to define the quality of EO by using standard AFNOR method. The EO of rosemary appeared as a yellowish oily liquid with characteristic smell. However, EO of white poplar was oily and pale yellow in color. EO of both plant species were confirmed to be of good quality [31].

3.3. Acute toxicity:

After administration of EO with gradual doses, the rats were followed by observations over a period of experimentation. It showed no severe clinical symptoms of pain, despite some common signs seen as anorexia, hypoactivity, which are reversible and have appeared in rats for a short time and then they returned to their activity. The absence of mortality and clinical signs therefore indicates that the EO of *R. officinalis* and *P. alba* are devoid of acute toxicity in rats in the given dose levels.

3.4. The anti-inflammatory activity of essential oils:

3.4.1. Body weight of rats:

The evolution of weight curve of rats in different groups given same food was given due consideration and all animals were weighed on the same scale. Regular monitoring of body weight of normal rats and the rats treatment groups (treated with the essential oil of *R. officinalis*, *P. alba* and Voltum) were analyzed and the results are presented in Figure 1.

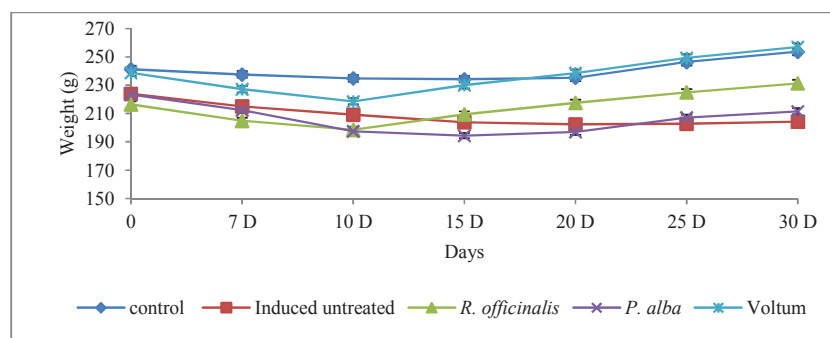


Figure 1: The body weight (g) of normal rats and treated with essential oil of *R. officinalis*, *P. alba* and Voltum.

The results of present study showed a significant decrease in body weight in rats injected with MIA as compared to the control group. This could be explained by the direct effect of unconscionable injury and pathophysiological factors of osteoarthritis process. Thus, the changes in body weight growth of rats is due to the process of defending the body against the trauma of osteoarthritis that require the intervention of several organic and biological systems and functions such as protein synthesis (eg collagen). There is also the division and

growth of different cell strains participant and / or involved in post-traumatic pathophysiological process [32]. Body weight reduction was used as an indicator of the deterioration of the general health of rats in different groups. Hence, the observed reduction in body weight of animals in the present study may be associated with the decrease in daily food in-take and effect of MIA treatment [33, 34]. It was noted that the diet consumed by the rats is decreased during the induction period.

Initially, there was a statistically significant change ($P < 0.05$) in body weight of rats of group 03 and 05 as compared to other group of rats. Similarly, weight reduction was recorded in rats of group 04 after 15 days of experimentation. On the contrary, body weight decreased along with more precisely at the joint in the rats of group 02 (MIA induced).

3.4.2. Biomarkers:

3.4.2.1. The C - reactive protein (CRP):

According to the results, the CRP values in rats of 04 lots (Induced untreated, *R. officinalis*, *P. alba*, Voltum) were remarkably high after 07 days of intra-articular injection of MIA since they exceeded the reference values in the normal rats ($< 300 \mu\text{g} / \text{mL}$) [35]. While the administration of various treatments (essential oil of *R. officinalis*, *P. alba*, Voltum) by intramuscular injection will decrease gradually to these values that CRP take its normal value to the 28th day (figure 2). There were higher mean CRP concentrations in group 2 after 7 days.

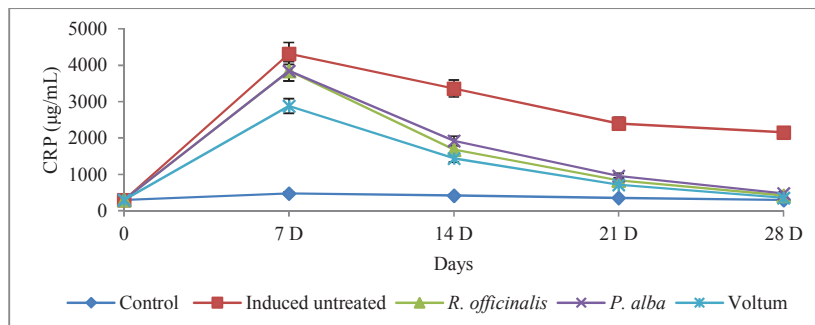


Figure 2: CRP values ($\mu\text{g} / \text{mL}$) of normal rats and treated with the essential oil of *R. officinalis*, *P. alba* and Voltum.

It also notes that the normal control group rats presented a stability of CRP values throughout the experiment. The assay of C-reactive protein (CRP) has shown some potential to predict the evolution of knee osteoarthritis [36]. Though, C-RP concentrations were related to reports of knee joint pain and knee injury [37]. The concentration of CRP does not only reflect the activity of the disease but also the joint destruction [38].

Given the known mechanistic relationship between CRP and IL-6, this suggests that IL-6 produced in the affected joint may in part be responsible for the elevations in systemic CRP seen in this population of patients [39]. Another potential stimulus of CRP production by hepatocytes is IL-1. This cytokine appears to work synergistically with IL-6 to promote CRP production [40].

3.4.2.2. Alkaline phosphatase (ALP):

Our results showed a statistically significant increase of the enzymatic activity of alkaline phosphatase (ALP) in rats receiving the MIA when compared to normal rats. While it recorded a recovery by a statistically significant decrease to take its normal value in treated groups opposed to induced untreated lot where the value of the ALP still increasing (figure 3).

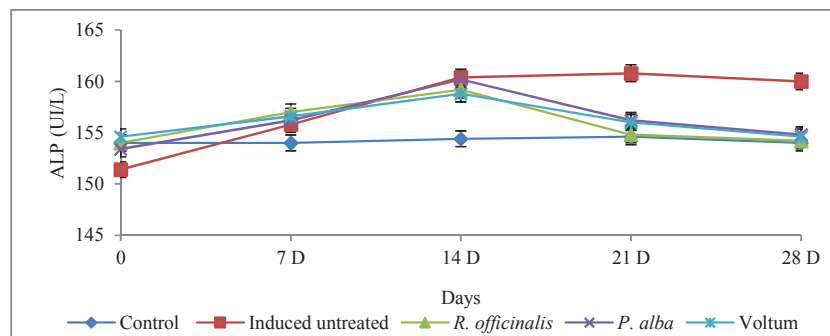


Figure 3: ALP values (UI/L) of normal rats and treated with the essential oil of *R. officinalis*, *P. alba* and Voltum.

The recovery of ALP values can be explained by the action of the essential oil of *R. officinalis*, *P. alba* and even Voltum drug with some difference in the degree of influence.

Phosphatases are critical enzymes in the biological system, responsible for the metabolism, detoxification, and the biosynthesis of energetic macromolecules for different physiological functions. Interference with these enzymes leads to biochemical disturbances, tissue damage and loss of cell function. In addition, alkaline phosphatase (ALP) is used as an indicator of the state of absorption and transport channels in the cell membrane [41].

3.4.2.3. Serum calcium:

There was an increase in calcium levels of the group of rats injected with MIA after 7 days of intra-articular administration (Figure 4). The average calcium concentration in rats of group 01 remains as increasing as and greater than the reference value obtained in the literature (2.35 ± 0.05) [42]. Our results are in agreement with the earlier reports on hypercalcemia which might occur due to malignancies, bone metastasis, primary hyperthyroidism, vitamin D intoxication, kidney failure, hypoparathyroidism and in hypomagnesaemia [43].

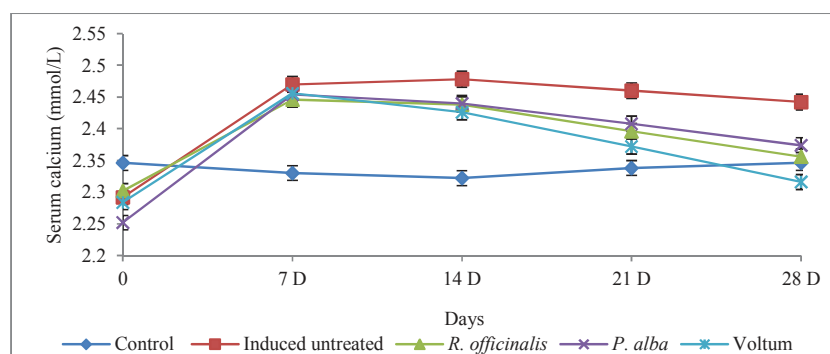


Figure 4: Calcium values (mmol/L) of normal rats and treated with the essential oil of *R. officinalis*, *P. alba* and Voltum.

While the administration of extracts of the essential oil from *R. officinalis*, *P. alba* and even drug Voltum promotes a decrease in the mean concentration of calcium. This decrease is observed after a period of 14 days until it reaches values that indicate the homeostatic balance of calcium at the end of the experiment. The homeostasis of calcium is controlled and coordinated by hormones, growth factors and cytokines [44].

3.4.2.4. Creatinine:

A week after MIA injection in rats, the biochemical assay showed an increase of creatinine values as compared to the control group (Figure 5). In addition, there was an increase in plasma creatinine which indicated decreased ability of kidneys to filter waste from blood and excrete it in urine [45]. However, on the contrary, subsequent measures following the intramuscular injection of the extracts in the group 03, 04 and 05 revealed the recovery of creatinine values.

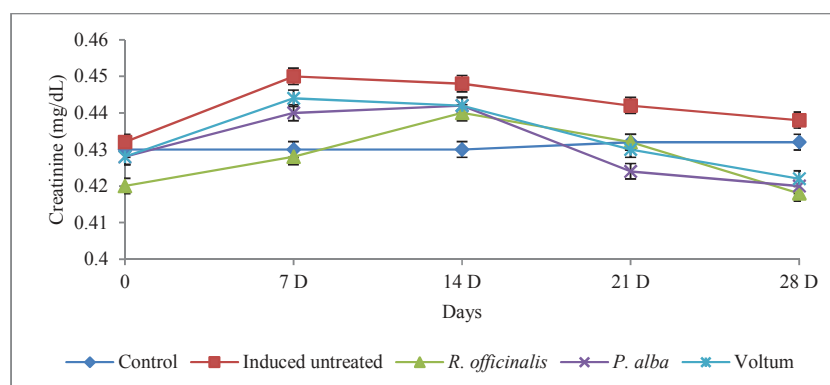


Figure 5: Creatinine values (mg/dL) of normal rats and treated with the essential oil of *R. officinalis*, *P. alba* and Voltum.

It appears that the MIA injection caused an increase of creatinine in rats which may justify the risk of renal impairment and deterioration of endogenous metabolism of rats. According Phillippe (1983) [46], the plasma

creatinine level provides information on the endogenous metabolism and the rate is proportional to the muscle mass of the body [47].

Transaminases:

MIA injection in rats induced an increase in liver enzymes (ALT, AST) which might be due to stress during the installation of osteoarthritis. On the other side, the treatment of rats of group 03, 04 and 05 showed a reduction in the enzymatic activity of alanine aminotransferase (ALT) observed on the 7th day after treatment. However, the activity of aspartate aminotransferase (AST) was decreased on the 14th day. Being from the group of NSAIDs, Voltum treatment group also showed increase in enzyme activity (Figure 6). The results showed that the treatment with EO of rosemary was appeared closer than the Voltum treatment.

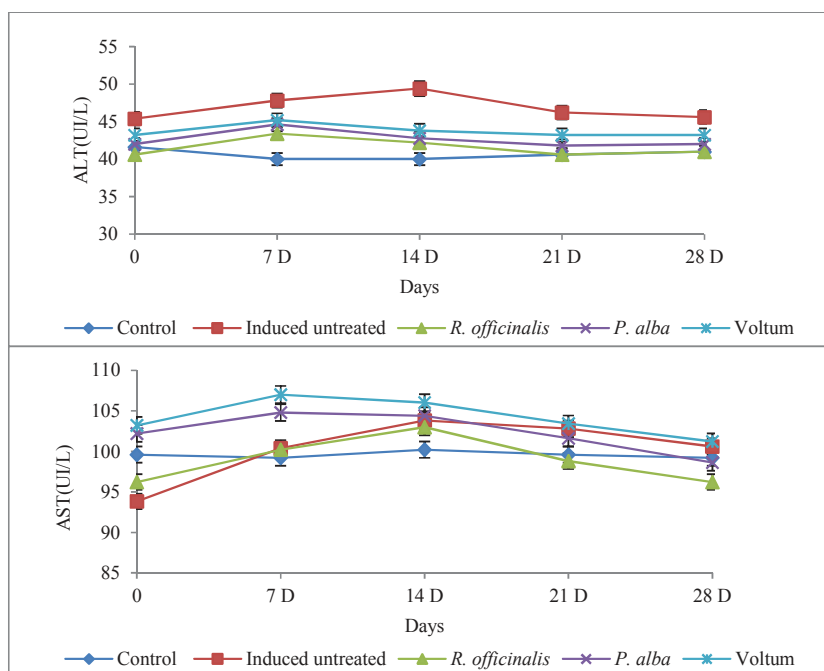


Figure 6: Values of ALT and AST (UI/L) of normal rats and treated with the essential oil of *R. officinalis*, *P. alba* and Voltum.

Transaminases are enzymes having a high metabolic activity within the cells. They are involved in some energy reactions. The increase in serum transaminases reflects cell injury, especially in the liver and certain cardiac cells [48]. In addition, the level of plasma ALT is also useful in indicating the existence of liver disease, since this enzyme is present in large amounts in the liver. It increases in plasma when degeneration or cell destruction is produced in this organ [49].

Conclusion:

The result from this study showed a significant difference in the concentrations of biochemical markers between the groups of rats treated and untreated. The effect of the essential oil of *R. officinalis* appeared closer than the Voltum drug that shows the best recovery of biochemical parameters. So, we conclude that the essential oil of *R. officinalis*, *P. alba* may be useful in preventing the destruction of joint architecture in the osteoarthritis pathology. Despite the availability of modern osteoarthritis treatment methods, man still opts for natural healing method to avoid side effects and use less expensive products with high efficiency. Therefore, natural products can give us this opportunity.

Acknowledgements:

We express our sincere gratitude to all staff of the Directorate of Education, Mascara.

Declaration of interest: The authors declare no conflicts of interests. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

REFERENCES

1. Bahorun T., 1997. Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle, Mauritius, 83-94.
2. Al-Ashban, RM., DA. Barrett, AH. Shah, 2005. Effects of chronic treatment with ethanolic extract of *Teucrium polium* in mice. J. Herb, Spices & Med. Plants, (4): 27-36.
3. Lhuillier, A., 2007. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*). Thèse de doctorat, Toulouse.
4. Beg, S., S. Swain, H. Hasan, M. Abdul-Barkat, and MS. Hussain, 2011. Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. Pharmacognosy Review 5(10):120-137. [doi: 10.4103/0973-7847.91102].
5. Aromatherapy, 2014. Online [http://www.essentialoilspedia.com/arthritis/].
6. Bader GN., PA. Mir, and ZA. Bhat, 2014. Present status of anti-inflammatory and anti-rheumatic phytoconstituents: a review. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 3(11):272-310.
7. AHPA., 2015. The AHPA, Botanical Identity References Compendium. The American Herbal Products Association (AHPA).
8. Juhas, S., A. Bukovska, S. Cikos, S. Czikkova, D. Fabian, and J. Koppel, 2009. Anti-Inflammatory Effects of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil in Mice. Acta Veterinaria Brno 78(1):121-122.
9. Perez S., M. Zavala, LG. Arias, and M. Ramos-Lopez, 2011. Anti-inflammatory activity of some essential oils. Journal of Essential Oil Research 23(5):38-44. [DOI: 10.1080/10412905.2011.9700480].
10. Adam, M., C. Berset, M. Kessler, and M. Hamburger, 2009. Review Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders. Journal of Ethnopharmacology 121:343-359.
11. Hussain, AI., F. Anwar, S. Ali, S. Chatha, A. Jabbar, 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology 4(4): online [http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822010000400027].
12. Raskovic, A., I. Milanovic, N. Pavlovic, T. Cebovic, S. Vukmirovic, and M. Mikov, 2014. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. BMC Complement. Altern. Med. 7(14): 225. [doi: 10.1186/1472-6882-14-225].
13. Turek, C., and FC. Stintzing, 2013. Stability of essential oils: Comprehensive Review in Food Sciences and Food Safety. 12(1): 40-53. [doi: 10.1111/1541-4337.12006].
14. Abu-Gharbia, MA., MN. Agban, A. El-Mewafy, R. El-Ghadban, and RZ. Abdelmasieh, 2015. Antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* essential oil against carbapenems resistant *Klebsiella pneumonia* strains (as nosocomial pathogen) isolated from intensive care units of two hospitals. Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Sciences 4(1):47-50.
15. Chen, Q., 2012. Osteoarthritis, Diagnosis, Treatment and Surgery. Publisher: pp. 1-416.
16. Bloom, J., 2014. Treat osteoarthritis with aromatherapy massage.
17. Altman, RD., 2012. Osteoarthritis (OA). Joint disorders, Musculoskeletal and connective tissue disorders. MSD Manual Professional Edition; Merck & Co., Inc. USA.
18. Kapoor M., and Mohamed N.N., 2015. Osteoarthritis: Pathogenesis, Diagnosis, Available Treatments, Drug Safety, Regenerative and Precision Medicine. CH-1, pp. 1-29.
19. Martel-Pelletier, J., et JP. Pelletier, 2010. Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? Eklem Cerrahisi. 21(1): p.2-14.
20. AFNOR., 1999. Huiles essentielles. Echantillonnage et méthode d'analyse, Volume 2 Monographie relative aux huiles essentielles. 663 P.
21. Tahraoui, A., ZH. Israili, & B. Lyoussi, 2010. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 132: 48-55.
22. Dunham, J., S. Hoedt-Schmidt, DA. Kalbhen, 1993. Prolonged effect of iodoacetate on articular cartilage and its modification by an anti-rheumatic drug. Int J Exp Pathol; 74: 283-9.
23. Guingamp, C., P. Gegout-Pottie, L. Philippe, 1997. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. Arthritis Rheum, 40:1670-9.
24. Kalbhen, DA., 1987. Chemical model of osteoarthritis--a pharmacological evaluation. *J Rheumatol*, 14 Spec, No, 130-131.
25. Lozada, CJ., and RD. Altman, 2005. Management of Osteoarthritis. A Textbook of Rheumatology, 15e éd. Vol. 2, p. 2257-2276.
26. Pincus, T., GG. Koch, T. Sokka, 2001. A randomized, double-blind, crossover clinical trial of diclofenac plus misoprostol versus acetaminophen in patients with osteoarthritis of the hip or knee. Arthritis and Rheumatism, 44 (7), 1587-1598.

27. Poole, R., S. Blake, M. Buschmann, 2010. Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 10-16.
28. Atik bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb bendiab, SA., 2007. Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*, 7: 6-11.
29. Rouabah, Y., 2010. Contribution à une étude quantitative des huiles essentielles dans deux espèces végétales: *Globularia alypum* L. et *Rosmarinus officinalis* L. Mém. Univ. Batna, P 68.
30. Zheljzkov, V.D., T. Astatkie, I. Zhalnov, and TD. Georgieva, 2015. Method for attaining rosemary essential oil with differential composition from dried or fresh material. *J. Oleo. Sci.* 64(5): 485-496. [doi: 10.5650/jos.ess14258].
31. Akbari, J., M. Saeed, D. Farzin, K. Morteza-Semnani, and Z. Esmaili, 2015. Transdermal absorption enhancing effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* on percutaneous absorption of Na diclofenac from topical gel. *Pharm. Biol.* 53(10): 1442-1447. [doi: 10.3109/13880209.2014.984855].
32. Shah, A.H., S. Qureshi, M. Tariq, and AM. Ageel, 1989. Toxicity studies on six plants used in the Traditional Arab System of Medicine. *Phytotherapy Res.* 3: 25-29.
33. Shah, A.H., MP. Bhandari, N.O. Al-Harbi, and R.M. Al-Ashban, 2014. Evaluation of gastro-protective activity and toxicity in different experimental models. *Biol. Med. J.*, 6:1 [http://dx.doi.org/10.4172/0974-8369.1000197].
34. Moreau, M., E. Troncy, S. Bichot, B. Lussier, 2010. Influence of changes in body weight on peak vertical force in osteoarthritic dogs: A possible bias in study outcome. *Vet Surg. Jan*; 39(1):43-7.
35. Laurell, C.B., 1972. Electroimmunoassay. *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, 29(124), 39.
36. Aletaha, D., V.P.K. Nell, T. Stamm, 2005. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res*; 7: R796-R806.
37. Wolfe, F., 1997. C - reactive protein but not erythrocyte sedimentation rate is associated with clinical severity in patients with osteoarthritis of the knee or hip. *J Rheumatol*; 24:1486-8.
38. Young-Min, S., T. Cawston, N. Marshall, 2007. Biomarkers predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis and perform well compared with traditional markers. *Arthritis Rheum*; 56:3236-47.
39. Matsumoto, T., T. Tsurumoto, H. Shindo, 2006. Interleukin-6. levels in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis correlated with the infiltration of inflammatory cells in synovial membrane. *Rheum Int*; 26: 1096e100.
40. Aronson, D., A. Goldberg, A. Roguin, S. Petcherski, D. Rimer, 2005. Effect of obesity on the relationship between plasma C-reactive protein and coronary artery stenosis in patients with stable angina. *Atherosclerosis*; 185:137.
41. Eraslan, G., M. Kanbur, S. Silici, 2009. Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. *Food and Chemical Toxicology.* 47: 86-91.
42. Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M., 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals/editors, Michael L. Bruss.*—6th ed. British Library, 909 p.
43. Marshall W.J., Bangert S.K., 2005. *Clinical Chemistry*, 5th Ed. Elsevier, London, 392p.
44. Feig, D.I., M. Mazzali, D.H. Kang, 2006. Serum uric acid: a risk factor and a target for treatment? *Journal of the American Society of Nephrology.* 17: S 69-73.
45. Philippe M., 1983. *Physiologie humaine*, édition Flammarion., P: 1002-1010.
46. Alain B., Bertrand M., Fourestier M., 1980. *Dictionnaire des constantes biologiques et physiques.* 5^{ème} édition Maloin: 523.
47. Latha RM., Geentha T., Varalakshmi P., 1998. Effect of *Vernonia cinerea* Flower extract in adjuvant induced arthritis. *General Pharmacology*, 31: 601-606.
48. Kew M.C., 2000. Serum amino transferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *Lancet.* 355: 591-592.
49. Hassoun, E.A., S.J. Stohs, 1995. Comparative studies on oxidative stress as a mechanism for the fetotoxicity of TCDD, endrin and lindane in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Teratol.* 51:186.