

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى أسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Laboratoire de Bioconversion, Génie Microbiologie et Sécurité Sanitaire.

THESE de DOCTORAT de 3^{ème} cycle

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Sciences, Technologie et Santé.

Intitulée

**Flavonoïdes et tanins contenus dans les extraits aqueux
de la plante *Aristolochia* : formulation galénique et
application thérapeutique**

Présentée par : M^{me} Attou Soumia

Soutenue le : 12 / 04 /2021

Devant le jury :

Président	Mr. Bouhadi D.	Maitre de conférences A	U. Mascara
Examineur	Mr. Hamoudi A.	Professeur	U. Tiaret
Examineur	Mr. Abouni B.	Professeur	U. SBA
Examineur	Mr. Benarba B.	Maitre de conférences A	U. Mascara
Directeur de thèse	Mr. Meddah B.	Professeur	U. Mascara

وَمَا تَوْفِيقِي إِلَّا بِاللَّهِ
عَلَيْهِ تَوَكَّلْتُ وَإِلَيْهِ أُنِيبُ

سورة هود الآية 88

Remerciement

Ce travail de thèse a été effectué principalement au Laboratoire de bioconversion, génie microbiologie et sécurité sanitaire, Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des Mascara, département de Biologie,
Sous la direction du Professeur **Meddah Boumediene**.

Avant tout, j'exprime ma profonde reconnaissance et toute ma gratitude aux Professeurs Monsieur **Meddah Boumediene** et Madame **Tir Touil Aicha** pour l'aide et le suivi qu'ils m'ont fournis tout au long de la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier monsieur le Professeur **Bouhadi Djilali** de l'Université de Mascara qui a consenti à participer à cette commission et a présidé le jury, qu'il trouve ici toute l'expression de ma considération.

Je suis très reconnaissante à Monsieur, Docteur **Belarba Bachir** de l'université de Mascara, qui m'a fait l'honneur de participer à cette commission et d'apporter un regard critique sur ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur **Abouni Bouziane** de l'université de Sidi Bel-Abbas pour sa participation au jury et lui demande d'accepter toute ma reconnaissance et qu'il trouve ici l'expression de ma haute considération.

Mes remerciements vont aussi le Professeur **Hamoudi Abdelhamid** de l'université de Tiaret, d'avoir accepté de juger ce modeste travail. Qu'il soit assuré de ma respectueuse et très sincère gratitude.

Je remercie également Messieurs les Docteurs **Slimani Khaled** et **Hemida Houari** pour m'avoir aidé dans l'interprétation des analyses radiologiques et histologiques

Je remercie particulièrement, Mme **Belmimoun Asma**, Melle **Sid Larbi Khadidja** et Mr **Belkhouidja Hamza**, pour leur disponibilité et encouragement

Un grand merci à mes amies : **Amina, Asma, Souhila et Ikram** pour leur aide et leur patience

Je remercie également toutes les personnes travaillantes au sein des laboratoires SNV de l'Université de Mascara, pour leur disponibilité

J'exprime également mes sincères remerciements au personnel de l'animalerie et à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicace

JE DEDIE CETTE THÈSE

A mes très chers parents,

Je ne savais pas comment exprimer mes sentiments pour leur sacrifice, patience, encouragement, l'expression de mon profond respect

A mon mari pour sa solidarité et sa patience

A mes chères filles Ibtihel et Radjaa

A mon adorable fils Djawed

A Mes frères et mes sœurs

A mes amies : Amina, Asma, Souhila, Karima , Meriem et Nadia

Résumé

De nombreuses études à travers le monde sont orientées vers la valorisation des substances naturelles d'origine végétale et l'évaluation de leurs activités biologiques. De plus, l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques est devenue nécessaire. Vu que les molécules bioactives qu'elles contiennent sont considérées comme une alternative à la plus part des médicaments synthétiques.

Le présent travail a été réalisé dans le but de la valorisation de deux genre de substances bioactives : flavonoïdes et tanins de la plante *Aristolochia longa* extraites à partir des feuilles et des racines par fractionnement liquide/liquide et en les identifiant par chromatographie couplée à la spectrophotométrie de masse HPLC-DAD-ESI-MS/MS. L'activité antioxydante a été également étudiée *in vitro*, alors que l'effet thérapeutique a été évalué *in vivo*, en utilisant un modèle expérimental de l'inflammation chronique : Arthrite rhumatoïde induit par adjuvant Complet de Freund chez le rat Wistar.

Le criblage phytochimique a révélé la présence de quelques composés bioactifs y compris les tanins et flavonoïdes. Le fractionnement par différents solvants a permis d'obtenir 16 fractions. La détermination des teneurs en flavonoïdes et tanins a montré que la fraction n-butanol flavonoïdique des feuilles est riche en flavonoïdes (4.54 ± 0.94 mg CA/g MS). De même, la fractions n-butanol tannique des racines a enregistré une teneur élevée en tanins (3.905 ± 0.24 mg CA/g MS).

Les résultats de l'activité antioxydante déterminée par les deux méthodes (DPPH et FRAP) indiquent que toutes les fractions n-butanol ont un potentiel antioxydant important. Cependant la meilleure activité est enregistrée par la fraction n-butanol flavonoïdique et tannique. Ce potentiel est du à la présence des flavonoïdes dans les feuilles et les tanins dans les racines. D'autre part l'identification par chromatographie des quatre fractions de n-butanol a confirmé l'hypothèse établie précédemment, où les profils du chromatogramme de n-butanol flavonoïdique des feuilles a montré la présence de trois composants majeurs : Apigenin-8-C-hexoside, Apigenin-7-O-glucoside et kaempferol-3-O-glucoside, tandis que, la fraction n-butanol tannique des racines a montré la présence de deux composants majeurs l'acide 1,3,4-tri-O gallogliquinique et Vescalagin.

L'effet thérapeutique de pommades formulées galéniquement à base des flavonoïdes (F1) et tanins(F2) sur le modèle d'arthrite rhumatoïde induit chez le rat par adjuvant Complet de Freund a montré que les deux pommades présentent une activité antiarthritique importante avec un différence dans le degré de l'efficacité du traitement. Cet effet est traduit chez l'animal par la diminution du volume de l'œdème, le gain du poids corporel, la restabilisation des valeurs de marqueurs biochimiques, la résolution articulaire et la reconstruction du cartilage chez les jeunes animaux utilisés.

Mots-clés : *Aristolochia longa*, flavonoïdes, tanins, activité antioxydante, HPLC, formulation galénique, application thérapeutique, rats Wistar, *in vivo*

Abstract

Many studies were focused on the evaluation of plants natural substances, and their biological activities. Thus the use of medicinal plants for therapeutic effects has become necessary. Indeed, these bioactive molecules are considered as an alternative to most synthetic drugs.

The aims presented in this thesis are to valuing two kind of bioactive compounds: flavonoids and tannins of the plant *Aristolochia longa* belongs to the genus *Aristolochia*, these compounds were extracted from the leaves and roots by liquid / liquid extraction and were identified by chromatography method. Antioxidant activity was studied *in vitro* using two methods (DPPH and FRAP). In addition, the therapeutic effect was evaluated *in vivo* using an experimental model of chronic inflammation: Rheumatoid arthritis induced by Freund's complete adjuvant in Wistar rats.

Phytochemical screening revealed the presence of some bioactive compounds including tannins and flavonoids. Fractionation with different solvents gave 16 fractions. Determination of the flavonoids and tannins contents showed that the leaves flavonoid n-butanol fraction is richer in flavonoids (4.54 ± 0.94 mg CA / g DM). Similarly, the roots tannic n-butanol fraction is richer in tannins (3.905 ± 0.24 mg CA / g DM).

All the n-butanol fractions showed an important antioxidant effect. However, the best activity is recorded by the flavonoid and tannin n-butanol fractions. This potential is due to the presence of flavonoids in the leaves and tannins in the roots. On the other hand, the identification of four n-butanol fractions confirmed the hypothesis established previously, where the chromatogram profiles showed the presence of three major components of flavonoids : Apigenin-8-C-hexoside, Apigenin-7-O-glucoside and kaempferol-3-O-glucoside, while the tannic n-butanol fraction of the roots showed the presence of two major components: 1,3,4 -tri-O gallogliquinic acid and Vescalagin.

The therapeutic effect of ointments formulated galenically on the basis of flavonoids (F1) and tannins (F2) in the model of rheumatoid arthritis induced by Freund's complete adjuvant has showed that both ointments presented a significant antiarthritic activity with a difference in the degree of efficacy of treatment. This effect is reflected with edema inhibition, weight gain, arthritic score, restabilization of the values of biochemical markers, joint resolution and cartilage reconstruction in young animals used

Keywords: *Aristolochia longa*, flavonoids, tannins, antioxidant activity, HPLC, galenic formulation, therapeutic application, Wistar rats, *in vivo*

ملخص

ركزت العديد من الدراسات حول العالم على تثمين المواد الطبيعية ذات الأصل النباتي وتقييم أنشطتها البيولوجية. لذلك أصبح استخدام النباتات الطبية للأغراض العلاجية أمراً ضرورياً ، وبالفعل تعتبر هذه الجزيئات النشطة بيولوجياً بديلاً لمعظم الأدوية الاصطناعية.

تم تنفيذ العمل الحالي بهدف تقييم مادتين حيويتين: الفلافونويد و التانات من نبات بورسطم ، باستخلاصهما من الأوراق والجذور عن طريق تجزئة السائل / السائل وتحديدتهما بواسطة كروماتوغرافيا . تم تقدير نشاط مضاد للأكسدة مخبرياً بطريقتين التقاط مباشر للجذور الحرة بطريقة إزاحة جذر 2،2 ديفينيل 1 بيكهيدرازيلو والقدرة على الإرجاع. تم تقييم التأثير العلاجي في الجسم الحي باستخدام نموذج تجريبي للالتهاب المزمن: التهاب المفاصل الروماتويدي الناجم عن مادة فروند عند الجرذان من نوع Wistar .

أظهر الفحص الكيميائي النباتي وجود بعض المركبات النشطة بيولوجياً بما في ذلك الفلافونويدات والتانات ، كما أن التجزئة بمذيبات مختلفة أعطت 16 كسراً ، وأظهر تحديد محتويات الفلافونويد والتانات أن كسورن -بيوتانول الفلافونويد في الأوراق غني بللفلافونويد ، كما سجلت كسورن -بيوتانول التانية للجذور نسبة عالية من التانات . أظهرت نتائج النشاط المضاد للأكسدة بطريقتين سالفنا الذكر أن جميع كسورن -بيوتانول لها نشاط مضاد للأكسدة ، ومع ذلك ، فإن أفضل فعالية سجلت بواسطة كسورن -بيوتانول للفلافونويد والتانات. ترجع هذه الإمكانية إلى وجود مركبات الفلافونويد في الأوراق والتانات في الجذور . من ناحية أخرى ، فإن التحديد الكروماتوغرافي للكسور الأربعة من ن -بيوتانول أكد الفرضية التي تم وضعها سابقاً ، حيث أظهر كسورن -بيوتانول الفلافونويد للأوراق وجود مكونين رئيسيين: كامفيرول وأبيجين ، بينما أظهر كسورن -بيوتانول التانيك للجذور وجود مكونين رئيسيين : حمض قالوقالنيك وفيسكالاجين.

أظهر التأثير العلاجي للمراهم المحضرة بالطريقة الصيدلانية على أساس مركبات الفلافونويد والتانات على نموذج التهاب المفاصل الروماتويدي أن المرهم الأول F1 هو أفضل علاج مضاد لالتهاب المفاصل مقارنة بالعلاج بالمرهم الثاني F2 . ينعكس هذا التأثير عند الحيوان من خلال انخفاض حجم إنتفاخ الأقدام ، زيادة في الوزن ، إعادة استقرار المقاييس البلازمية ، إعادة بناء الغضروف.

الكلمات الرئيسية: نبتة بورسطم ، الفلافونويد ، التانات ، نشاط مضاد الأكسدة ، الكروماتوغرافيا ، تركيبة الجالينيك ، التطبيق العلاجي. جرذان Wistar. *in vivo*

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale 01

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Rappel sur le genre *Aristolochia*

1.1 Définition	03
1.2. Quelques activités biologiques du genre <i>Aristolochia</i>	03
1.3. Composition chimique du genre <i>Aristolochia</i>	06
1.3.1. Acide aristolochique et Aistolactames	06
1.3.2. Terpénoïdes	07
1.3.3. Flavonoïdes	08
1.3.4. Tanins	11
1.4 .Présentation de la plante <i>Aristolochia longa</i>	14
1.4.1. Description botanique	14
1.4.2. Habitat et localisation géographique	15
1.4.3. Systématique et classification	15
1.4.4. Utilisation Thérapeutique	16

Chapitre 2. Notions sur l'inflammation

2.1. Définition	17
2.2. Inflammation aigüe	17
2.3. Inflammation chronique	18
2.4. Les anti-inflammatoires	29
2.5. Polyarthrite Rhumatoïde	22
2.5.1. Articulation synoviale saine	22
2.5.2. La physiopathologie de Polyarthrite Rhumatoïde	25
2.5.3. Diagnostic de la poly arthrite rhumatoïde	28
2.5.4. Traitement médicamenteux de PR	30

Chapitre 3 .Formes galéniques en phytothérapie

3.1. La phytothérapie	31
3.2. Les Formes galéniques à base de plantes	31
3.2.1. Formes solides	32
3.2.2. Formes liquides	33
3.2.3. Formes pour usage externe	34
3.3. Exemple de quelques plantes médicinales thérapeutiques	39

Partie 2 : Etude expérimentale

Chapitre 1. Matériels et méthodes

1. Objectifs	40
2. Matériels	40
2.1. Matériel végétal	40
2.2. Animaux d'expérimentation	42
3. Méthodes	42
3.1. Screening phytochimique	43
3.2. Préparation des extraits	43
3.2.1. Extraction des flavonoïdes	43
3.2.3. Extraction des tanins	45
3.3. Calcul des rendements d'extraction	46
3.4. Analyse colorimétrique et spectrophotométrique des extraits	47
3.4.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux	47
3.4.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes	47
3.4.3. Détermination de la teneur en tanins	48
3.5. Evaluation de l'activité antioxydante	49
3.5.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)	49
3.5.2. Pouvoir réducteur du fer FRAP	50
3.6. Identification chimique des fractions	50
3.7. Etude de la toxicité aiguë des extraits de fractions par voie cutanée chez les rats <i>Wistar</i>	51
3.8. Préparation et contrôle de la formulation galénique à base des extraits d' <i>Aristolochia longa</i>	52
3.8. 1. Préparation de la formulation galénique	52
3.8. 2. Contrôle de la qualité de la formulation galénique	53
3.9. Evaluation de l'effet thérapeutique de la formulation galénique	59
3.9.1. Choix de modèle expérimental de la polyarthrite rhumatoïde	59
3.9.2. Répartition des groupes	60
3.9.3. Induction	60
3.9.4. Traitement	60
3.9.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	60

Chapitre 2. Résultats et discussion

2.1. Screening phytochimique	69
2.2. Rendements d'extraction	69
2.2.1. Rendements d'extraction des extraits bruts	70
2.2.2. Rendements d'extraction des différentes fractions	70
2.3. Analyse colorimétrique et spectrophotométrique des extraits bruts et fractions	72
2.3.1. Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins totaux des extraits bruts	72
2.3.2. Teneur en flavonoïdes et Tanins condensés de différentes fractions	73

2.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits des fractions	74
2.4.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl(DPPH)	74
2.4.2. Le pouvoir réducteur des ions ferrique (FRAP)	78
2.5. Analyse Chromatographique par HPLC-DAD-ESI-MS	81
2.6. Toxicité cutanée aigue	88
2.7. Etude de la formulation galénique	90
2.7.1. Caractères macroscopiques et organoleptique	90
2.7.2. Contrôle microbiologique	91
2.7.3. Test de la stabilité	92
2.7.4. Test d'irritation cutanée	94
2.8. Evaluation de l'effet anti inflammatoire de formulations galéniques sur le modèle d'arthrite rhumatoïde	96
2.8.1. Evaluation de paramètres cliniques	96
2.8.2. Evaluation de paramètres biologiques	100
2.8.3. Evaluation des paramètres biochimiques	103
2.8.4. Analyse radiographique	110
2.8.5. Analyse histologique	112
Conclusion générale et perspectives	115
Références bibliographiques	117
Annexes	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
1	Mécanismes d'actions anti-inflammatoires de différents flavonoïdes	10
2	Examens biologiques systématiques réalisés lors d'une suspicion de PR	29
3	Différents traitements suivie dans la prise en charge thérapeutique de la PR	30
4	Exemples des excipients pour la préparation de pommades	37
5	Exemples de Conservateurs antimicrobiens et antioxydants utilisés pour les préparations galéniques à usage externe	38
6	Exemples de formes galéniques de plantes médicinales et leurs effets thérapeutiques	39
7	Lieu et site de récolte de la plante	40
8	Composition de la formulation galénique	52
9	Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles	55
10	Echelle numérique de l'érythème et l'œdème	58
11	Les différents scores de l'indice arthritique	62
12	Constituants Phytochimique de la plante <i>A. longa</i>	69
13	Aspect, Couleur et rendements des extraits bruts	70
14	Aspect, couleur et rendements des extraits après fractionnement	71
15	Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins totaux dans les extraits bruts des feuilles et racines d' <i>A. longa</i>	72
16	Dosage des flavonoïdes et tanins condensées dans les extraits des fractions obtenus des feuilles et racines d' <i>A. longa</i>	73
17	Identification par HPLC-ESI-MS des composés phénoliques des fractions butanol flavonoïdique des feuilles et racines d' <i>A. longa</i>	83
18	Identification par HPLC-ESI-MS des composés phénoliques des fractions butanol tannique des feuilles et racines d' <i>A. longa</i>	86
19	Les caractéristiques macroscopiques, organoleptiques et physicochimiques des formes galéniques F1 et F2 préparées à partir des extraits de feuilles et racines d' <i>A. longa</i>	91
20	Résultats de test de stabilité de pommades F1 et F2	93
21	Valeurs numériques de l'évaluation de l'œdème et de l'érythème suivant l'échelle de Draize de la formulation galénique F1 à base des flavonoïdes à 5%	94
22	Valeurs numériques de l'évaluation de l'œdème et de l'érythème suivant l'échelle de Draize de la formulation F2 à base des tanins à 5%	94

LISTES DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Structure chimique d'acide aristolochique I(AAI) et II(AAII)	06
2	Aristolactames du genre <i>Aristolochia</i> ("1":Aristolactame I,"2": aristolactame AII "3":aristolactame I a N-B-D)	07
3	Terpenoides du genre <i>Aristolochia</i> . (1): Monoterpenoides ;(2): sequiterpenoides ; (3): diterpenoides (Kuo <i>et al</i> , 2012)	07
4	Structure de base de flavonoïdes et ses classes	08
5	Mécanismes d'action des flavonoïdes dans la polyarthrite rhumatoïde (Min-Hsiung <i>et al</i> , 2010)	10
6	Structure de tanins hydrolysables (1) et tanins condensés (02) (Macáková <i>et al</i> , 2014)	12
7	<i>Aristolochia longa</i> (photo originale, 2015)	14
8	Schématisation de la relation entre la cellule et la matrice extracellulaire du cartilage : collagènes, protéoglycanes et molécules non collagéniques.	24
9	Schéma du développement de Polyarthrite Rhumatoïde	26
10	Schéma général récapitulatif de la physiopathologie de la PR.	27
11	La carte géographique représentons le site de récolte	41
12	Les feuilles (A) et les racines (B) d' <i>Aristolochia longa</i>	41
13	Protocole expérimental d'extraction des flavonoïdes	44
14	Protocole expérimental d'extraction des tannins	46
15	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	47
16	Courbe d'étalonnage de Catéchine	48
17	Courbe d'étalonnage de quercétine	48
18	Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique	49
19	Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique	50
20	Schémas récapitulatif de contrôle microbiologique de la forme galénique (pommade)	56
21	Pourcentage d'inhibition de DPPH par les fractions de feuilles et racines d' <i>Aristolochia longa</i> ;(A): extraits de fractions flavonoïque des feuilles,(B):Extraits de fractions flavonoïque des racines ;(C): Extraits de fractions tannique des feuilles,(D): Extraits de fractions tannique des racines	75
22	IC50 des différentes fractions flavonoidiques et tannique des feuilles et racines en mg/ml	77
23	Cinétique de l'activité réductrice des ions ferreux par les fractions de feuilles et racines d' <i>Aristolochia longa</i> ;(A): extraits des fractions flavonoïque des feuilles,(B):Extraits Fractions flavonoïque des racines ;(C): Extraits Fractions tannique des feuilles,(D): Extraits Fractions tannique des racines	79
24	EC50 des fractions de feuilles et racines d' <i>Aristolochia longa</i>	80
25	Chromatogramme d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction n-butanol flavonoidiques des feuilles d' <i>A.longa</i>	82

26	Chromatogramme d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction n-butanol flavonoidiques des racines d' <i>A.longa</i>	82
27	Chromatogramme d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction n-butanol tannique des feuilles d' <i>A.longa</i>	85
28	Chromatogramme d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction n-butanol tannique des racines d' <i>A.longa</i>	85
29	Evolution du poids corporel des rats témoins et traités (exprimé en g) par l'extrait de fraction n-butanol flavonoidique des feuilles d' <i>A.longa</i> (A, B) et l'extrait de fraction n-butanol tannique de racines d' <i>A.longa</i> (C, D) .	89
30	Evolution du poids corporel des rats pendant la période d'expérimentation. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, **: p < 0. 01, par rapport au groupe témoin (Test d'ANOVA)	96
31	Evolution de l'œdème des rats induits non traités et traités pendant l'expérimentation. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001 par rapport au groupe des rats induits non traités (Test d'ANOVA)	97
32	Pourcentage d'inhibition de l'œdème pendant le traitement. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001 ; **: p < 0. 01, *: p < 0.05 par rapport au groupe traité par diclofénac (Test d'ANOVA)	98
33	Effets des traitements (vaseline, F1, F2 et diclofénac) sur le score arthritique dans le modèle d'adjuvant complet de Freund. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)	99
34	Poids relatif des organes des rats témoins sains, induits non traités et traités par vaseline, F1, F2 et diclofénac.Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) **: p < 0. 01, *: p < 0.05 par rapport au groupe témoins. (Test d'ANOVA)	101
35	Indices de la rate et du thymus de rats témoins, rats induits non traités et des rats traités par vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, différence significative par rapport au groupe témoin. $\neq \neq \neq$:p<0.001, $\neq \neq$:p<0.01, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)	102
36	Valeurs de la CRP chez les rats témoins, induits non traités, traités par la vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, **: p < 0. 01, différence significative par rapport au groupe témoins. $\neq \neq \neq$:p<0.001, \neq , différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)	104
37	Valeurs du facteur rhumatoïde chez les rats témoins, induits non traités, traités par la vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, différence significative par rapport au groupe témoin. $\neq \neq \neq$:p<0.001, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)	105

38	Valeurs de la calcémie chez les rats témoins, induits non traités, traités par la vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, différence significative par rapport au groupe témoin. $\neq \neq \neq$:p<0.001, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)	107
39	Valeurs de PAL chez les rats témoins, induits non traités, traités par la vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, différence significative par rapport au groupe témoins. $\neq \neq \neq$:p<0.001, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)	108
40	Evolution des enzymes hépatique Aspartate aminotransférase (ASAT-TGO) avant et après le traitement par vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, différence significative par rapport au groupe témoins. $\neq \neq \neq$:p<0.001, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)	109
41	Evolution des enzymes hépatique Alanine aminotransférase (ALAT-TGP) avant et après traitement par vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, **: p < 0. 01, différence significative par rapport au groupe témoins. $\neq \neq \neq$:p<0.001, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)	109
42	Images radiologiques de pattes des rats après l'induction de CFA et après le traitement. T : témoin sain ; N-T : induit non traité ; T-V : traité par vaseline ; T-P1 : traité par pommade F1 ; T-P2 : traité par pommade F2; T-DIC : traité par diclofénac. b et c : épaissement des parties molles et pincement de l'interligne articulaire. d : une tuméfaction synoviale réduite et léger pincement de l'interligne articulaire.	111
43	Images des coupes histologiques de l'articulation de la cheville. A :Témoin sain ; B : non traité (" b ":hyperplasie de la membrane synoviale « synovite ») ; C :traité par vaseline;(" c ":formation d'un pannus) X40 ; D : traité par formulation F1 ; E :traité par formulation F2(" e " :Formation d'une fibrose inflammatoire) ; F : traité par diclofénac X40 (" f " :cavité articulaire normale) ; G : Fibrillation de la couche superficielle du cartilage articulaire X100 ; H :Inflammation granulomateuse X100	113

LISTE DES ABREVIATIONS

AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AIS	Anti-inflammatoires stéroïdiens
COX-2	Cyclooxygenase-2
COX-1	Cyclooxygenase-1
PGE2	Prostaglandin E2
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale- α (Tumor Necrosis Factor- α)
IP	Indice Primaire
TSA	Milieu gélosé aux peptones de caséine et de soja (Tryptic Soy Agar)
TSB	Milieu liquide aux peptones de caséine et du soja (Tryptic Soy Broth)
TSE	Solution tampon peptonée au Chlorure de sodium
UFC/g	Unité Formant Colonies par gramme de produit
TR	Temps de rétention
CFA	Adjuvant complet de Freund
PG	Protéoglycane
MEC	Matrice Extracellulaire
ALAT	Alanine aminotransférase
ASAT	Aspartate aminotransférase
TGO	Transaminase Glutamo-oxalo-acétique
TGP	Transaminase glutamopyruvique
PAL	Phosphatase alcaline
CRP	Protéine réactive C
FR	Facteur rhumatoïde
PR	Polyarthrite rhumatoïde
UI	Unité internationale

Introduction générale

Introduction générale

Depuis l'antiquité, les produits naturels d'origine végétale, animale, et végétale ont été largement utilisés pour traiter de nombreuses maladies (Laudato *et al.*, 2013 ;Yuan *et al.*, 2016) .D'ailleurs, les plantes médicinales et les microorganismes ont été considérés comme les principales sources des médicaments. Cependant, dans la plus part des cas, le terme produit naturel désigne des métabolites secondaires (Dar *et al.*, 2017).

Ces métabolites secondaires d'origine végétale jouent un rôle essentiel dans le développement, la croissance et la défense des plantes. En effet, ils fournissent une réponse de défense locale ou systémique aux attaques d'agents pathogènes et d'herbivores (Kutchan, 2001).En plus, ils ont diverses fonctions dans la communication cellulaire à l'intérieur et entre les plantes (Krishnananda *et al.*, 2016).

Chez les plantes, environ 8000 composés phénoliques tels que les tanins, les alcaloïdes et les flavonoïdes ont été décrites (Rodney *et al.*, 2000). Des études *in vitro*, ont montré que les phénols naturels ont des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anticancéreuses, antivirales, anti-inflammatoires et des actions vasodilatatrices (Santos *et al.*, 2000 ; Padilla *et al.*,2007 ;Dietrich *et al.*,2004 ; Prats *et al.*, 2007 ; Benarba *et al.*, 2012). Ils sont également considérés comme une alternative de la plupart des médicaments synthétiques et autres composés commercialisés. (Durairaj *et al.*, 2018).

Bien que de nombreux médicaments synthétiques soient réservés à l'humanité, néanmoins certains sont associés à des effets secondaires graves. (Nisar *et al.*, 2017). De même, la phytothérapie permet de remplacer les molécules de synthèse chimique lorsque celles-ci ne sont plus tolérées ou acceptées par le patient. Citons par exemple le cas des antiinflammatoires, des antidépresseurs, ou encore des anxiolytiques (Chabrier, 2010).

L'inflammation est l'une de problèmes de santé les plus fréquents dans le monde qui incluent le dysfonctionnement du système immunitaire (Polyarthrite rhumatoïde, athérosclérose, diabète et troubles neurodégénératifs) (Mbiantcha *et al.*, 2017). Le traitement de l'inflammation implique la compréhension de certains mécanismes qui peuvent être utilisés comme cibles thérapeutiques pour nouveaux médicaments à partir de plantes médicinales (Liu *et al.*, 2017 ; Zaynab *et al.*, 2018)

Pour cette raison, la découverte de nouveaux médicaments ayant moins d'effets secondaires et capables de cibler les mécanismes impliqués dans la pathogenèse de différentes maladies est devenue nécessaire. En effet, selon l'action thérapeutique d'une plante médicinale ou une biomolécule, plusieurs formes galéniques ont été mises en évidence (Mamadou, 2009 ; Sharififar *et al.*, 2009 ; Bonesi *et al.*, 2016 ; Aiyalu *et al.*, 2016).

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation thérapeutique des biomolécules à partir de plantes médicinales algériennes. A la lumière de cet objectif principal, notre thèse est divisée en deux parties. La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique, qui comporte, un rappel sur la plante : *Aristolochia longa* appartient au genre *Aristolochia*, reconnu par son activité anticancéreuse, antibactérienne, antioxydante, des notions sur l'inflammation et les différentes formes galéniques en phytothérapie. Afin de valoriser quelques substances bioactives de cette plante, la partie expérimentale a permis de réaliser les études suivantes :

- Extraction de deux biomolécules : flavonoïdes et tanins par fractionnement en utilisant différents solvants organiques
- Etude quantitative des flavonoïdes et tanins présents dans les différents extraits et évaluation de leur activité antioxydante par le piégeage du radical libre et la capacité de la réduction du fer.
- Identification et détermination de la composition chimique des fractions par chromatographie liquide à haute performance (HPLC-DAD-ESI-MS/MS).
- Préparation des formes galéniques à partir des extraits de fractions et évaluation de leur activité thérapeutique sur un modèle expérimental chronique chez le rat Wistar: arthrite rhumatoïde induit par Adjuvant Complet de Freund en suivant leur effet sur les marqueurs biochimiques et sur l'articulation.

Les résultats obtenus sont interprétés et discutés à la lumière de la littérature.

Enfin le travail est clôturé par une conclusion et des perspectives sur l'intérêt de la valorisation de ces plantes.

Synthèse bibliographique

« La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment il évoluera l'imprévisible est dans la nature même de la science »

(François Jacob)

Chapitre 1

Rappel sur le genre Aristolochia

1. Rappel sur le genre *Aristolochia*

1.1. Définition

Aristolochia est un genre appartient à la famille des *Aristolochiaceae*. Il comprend environ 500 espèces (Neinhuis *et al.*, 2005). Ce sont des plantes herbacées vivaces, d'arbustes inférieurs ou d'arbustes contenant des huiles essentielles, tropicales, subtropicales. Il est répandu en Asie tropicale, en Afrique et en Amérique de sud. Déverses espèces ont été utilisées sous forme des médicaments bruts comme anodynes et détoxifiants (Wu *et al.*, 2005)

En effet, le genre *Aristolochia* a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise pour traiter des morsures de serpents, des plaies purulentes et des tumeurs. Ses diverses fonctions biologiques comprennent le soulagement de l'hypertension et des rhumatismes, le traitement de l'œdème ainsi que ses effets analgésiques et diurétique (Udhaya *et al.*, 2017)

De nombreuses plantes du genre *Aristolochia* sont connues par leurs activités biologiques y compris les activités antimicrobiennes, antiallergiques, antioxydantes, antiinflammatoires, analgésiques. Ces propriétés biologiques ont été attribuées à un large éventail de composants bioactifs. (Dhouioui *et al.*, 2016). En effet, des études phytochimiques sur des plantes du genre *Aristolochia* ont donné différents types de composés ayant des activités antitumorales, antiagrégants plaquettaires, immunomodulatrices et antifertilité (Benarba *et al.*, 2014).

1.2. Quelques activités biologiques du genre *Aristolochia*

1.2.1. Activité antioxydante

Thirugnanasampandan *et al* (2008) ont étudié l'activité antioxydante de quatre espèces *Aristolochia* (*Aristolochia brasiliensis* Mart et Zucc, *Aristolochia bracteolata* Retz, *Aristolochia indica* Linn, et *Aristolochia tagala* Cham). Les résultats montrent que les extraits d'éther de pétrole et acétate d'éthyle d'*Aristolochia tagala* capables d'inhiber les voies d'enzymes oxydantes de l'activité Piégeage du radical libre DPPH et pouvoir réducteur.

Papuc *et al.*, 2010 ont évalué l'activité de piégeage des radicaux libres (DPPH, anion superoxyde, radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène, oxyde nitrique) et le pouvoir réducteur de métaux ferreux Fe^{+2} des extraits alcoolique d'*Aristolochia climatis*. Les résultats montrent que les polyphénols contenus dans les extraits ont la capacité de réduire les ions Fe et de donner d'hydrogène aux radicaux libres DPPH pour devenir une molécule stable.

L'extrait éthanolique d'*Aristolochia albida* a montré une activité antioxydante importante que les extraits hydroéthanolique et aqueux. Cette capacité antiradicalaire due à la présence des composés phénoliques identifiés par screening phytochimique (Guinnin *et al.*, 2016)

1.2.2. Activité anticancéreuse

L'activité anticancéreuse de quatre extraits (éthanolique, hydroéthanolique, extrait aqueux et dichlorométhanolique) des racines d'*Aristolochia ringens* Vahl a été évaluée *in vitro* sur quatre lignées cellulaires du Cancer humain (A549, HCT-116, PC3 et THP-1) et *in vivo* sur trois modèles (le Sarcome d'ascite -180, la leucémie de lymphoïde L1210 et modèle du tumeur solide S-180). L'extrait éthanolique était le plus cytotoxique sur les cellules de lignée PC3 avec une valeur d'IC50 égale à 3 µg/ml. Ainsi, l'inhibition dose-réponse de la croissance de cellules tumorales de l'ascite par le même extrait (73,56%, 70,79% et 79,51% aux doses de 80mg/kg, 100mg/kg et 120mg/kg respectivement) a été observée (Akindede *et al.*, 2014)

L'huile essentielle de la partie aérienne d'*Aristolochia fordiana* Hemsl a démontré une activité cytotoxique temps-dépendante contre deux lignées cellulaires tumorales humaines, HepG2 (cellules de carcinome hépatocellulaire hépatique) et MCF-7 (cellules d'adénocarcinome du sein humain) à des concentrations croissantes avec des IC50 de 0,69 mg / ml et 0,22 mg / ml respectivement. β-caryophyllène, limonène et linalool, sont les principaux composants ont des effets cytotoxiques importants. (Su *et al.*, 2019)

1.2.3. Activité antimicrobienne

Murugan et Mohan (2012) ont testé cinq extraits des feuilles et tiges de la plante *Aristolochia indica* contre six germes pathogènes. Les extraits méthanolique, acétonique et éther de pétrole ont montré une bonne activité antibactérienne, et que les zones d'inhibition varient entre 1mm et 6mm.

L'effet antifongique de l'extrait méthanolique et aqueux des feuilles d'*Aristolochia bracteata*, Retz était évalué sur *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus indicus* et *Mucor indicus*, une activité antifongique importante contre *Rhizopus indicus* est observée par l'extrait méthanolique avec une zone d'inhibition de 18mm à 200mg d'extrait. (Deepa *et al.*, 2012)

Trois extraits (hexanique, acétate d'éthyle et méthanolique) d'*Aristolochia bracteolata* Linn ont été testés sur 12 germes pathogènes. L'extrait méthanolique était le meilleur antibactérien sur la plus part des germes avec une zone d'inhibition proche à celle du standard (streptomycine). Une zone d'inhibition maximale de 24 mm été remarqué chez le même extrait sur *Bacillus subtilis* avec une CMI égale à 5mg/ml (Trayee *et al.*, 2016).

1.2.4. Activité antiinflammatoire

L'effet antiinflammatoire de l'extrait éthanolique de la plante *Aristolochia krisagathra* a été évalué sur un modèle d'œdème de patte de rat albinos induit par la carraghénine. Le pourcentage d'inhibition étaient 76,19% et 87,19% à 200 mg / kg et 400 mg / kg respectivement. Les résultats ont été comparés à l'indométacine qui a montré une réduction de la patte de 85,11% à 10 mg / kg (Koilpitchai *et al.*, 2016).

Janani et Revathi, 2018 ont évalué l'activité antiinflammatoire *in vitro* d'extrait méthanolique d'*Aristolochia indica* par deux méthodes : Inhibition de la dénaturation de l'albumine et test d'hémolyse induite par la chaleur. L'extrait a montré un effet antiinflammatoire dose-dépendante.

1.2.5. Activité antiallergique

l'activité antiallergique d'extrait chloroformique de la plante *Aristolochia bracteolata* Lank . a montré un effet inhibiteur sur la sécrétion de l'oxyde nitrite synthétase, sécrétion des médiateurs inflammatoires et la stabilisation de la membrane des mastocytes (Chitme *et al.*, 2010) .

1.2.6. Activité cicatrisante

Jayasutha *et al.*, 2011, ont étudié l'activité cicatrisante de l'extrait éthanolique d'*Aristolochia bracteata*. Un potentiel thérapeutique d'une formulation galénique (pommade à 5%) à base d'extrait éthanolique a été observé sur un modèle de plaie chez des rats Wistar. L'activité cicatrisante était significative comparable a celle de pommade de référence (la nitrofurazone).

1.2.7 Activité antidiarrhéique

L'extrait aqueux des racines d'*Aristolochia argentina* Gris a été testé sur deux modèles diarrhéiques induits par l'huile de ricin et le sulfate de magnésium chez les souris. L'effet de l'extrait queux a montré une activité antidiarrhéique significative à une dose de 250 mg / kg (Paredes *et al.*, 2016).

Cette activité a été interprétée par la présence des flavonoïdes qui inhibent la motilité et la sécrétion intestinales chez les rongeurs médiés par les récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques et le calcium, et les tanins qui réduisent la sécrétion et rendre le mucus intestinal résistant grâce à la formation du complexe tanin -protéine (Paredes *et al.*, 2016)

1.3. Composition chimique du genre *Aristolochia*

Entre 2004 et 2011, plus de dix-huit espèces d'*Aristolochia* ont été étudiées pour leurs constituants chimiques à travers le monde, et divers constituants ont été caractérisés .Les métabolites secondaires des espèces d'*Aristolochia* couvrent 16 groupes principaux classés selon leurs structures chimiques, y compris les acides et esters aristolochiques, les aristolactames, les aporphines, les protoberberines, les isoquinolines, les benzylisoquinolines, les amides, les flavonoïdes, les lignanes, les éthers biphényliques, les coumarines, les tétralones, les terpénoïdes, les benzénoïdes, les stéroïdes (Kuo *et al.*, 2016).Parmi ces métabolites secondaires les plus fréquentes on site :

1.3.1. Acide aristolochique et Aistolactames

Les acides aristolochiques sont un groupe de composés naturels produits par les plantes de la famille *Aristolochaceae*. Ils se trouvent principalement dans le genre *Aristolochia*, mais peuvent également être trouvés dans d'autres genres appartenant à la même famille comme *Asarum* et *Bragantia*. De plus, ils sont composés par une mixture d'acides carboxyliques nitrophénanthrènes. Par ailleurs, l'acide aristolochique I est le plus abondant, suivi par l'acide aristolochique II (figure 1)(Okhale *et al.*, 2019)

Néanmoins, les acides aristolochiques capables d'induire une néphrotoxicité .Cette toxicité a été confirmée *in vitro* sur les cellules de rein d'opossum, En effet, elle a démontré une inhibition significative de l'endocytose des protéines médiée par la mégaline (Nortier *et al.*, 2013)

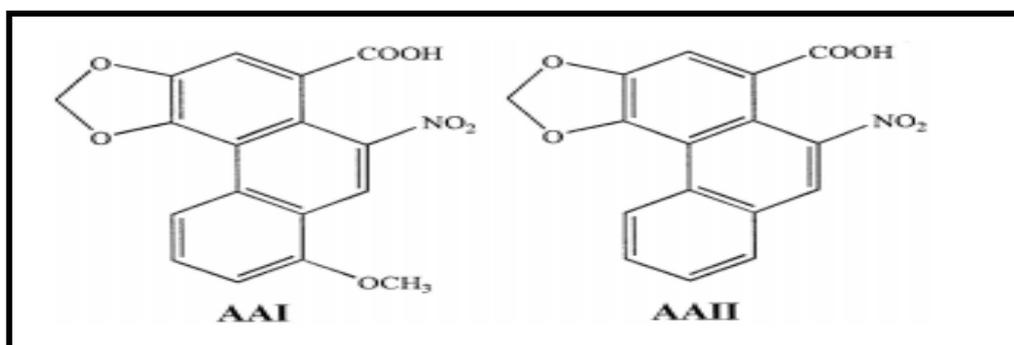


Figure 1 : Structure chimique d'acide aristolochique I(AAI) et II(AAII) (Okhale *et al.*, 2019)

Les aristolactames sont des petits groupes d'alcaloïdes de lactames phénanthrènes, liés structurellement et bio génétiquement à des aporphines. (Couture *et al.*, 2002). L'aristolactame I, l'aristolactame AII et l'aristolactame Ia *N*-β-D-glucoside étaient les aristolactames les plus fréquemment rencontrés chez le genre *Aristolochia* (figure 2) (Kuo *et al.*, 2012)

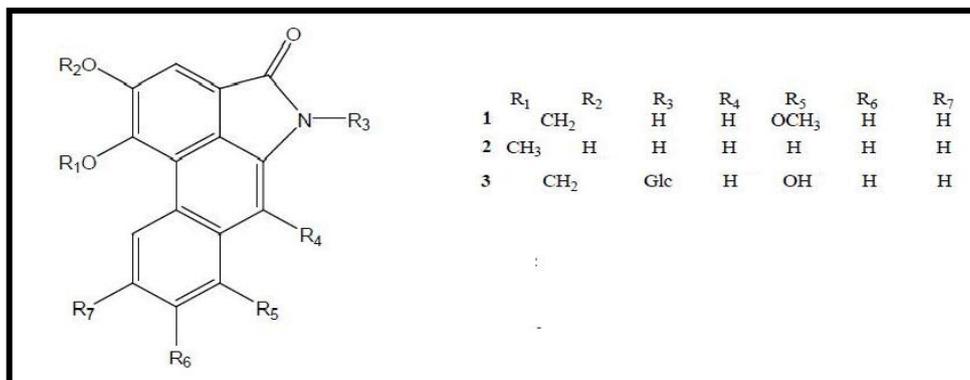


Figure 2 : Aristolactames du genre *Aristolochia*. "1" : Aristolactame I, "2" : aristolactame AII, "3" :aristolactame I a *N*-β-D) (Kuo *et al.*, 2012)

1.3.2. Tèrpenoïdes

Les tèrpenoïdes ou isoprènoïdes, sont des substances naturelles à base d'isoprène, ils jouent un rôle fondamental dans le métabolisme de tous les organismes (Matthew *et al.*, 2019). En outre, les espèces d'*Aristolochia* comprennent les mono-, sequi-, di-, tri- et tétraterpènoïdes. (Wu, 2004).Les monoterpènes C₁₀ sont connus comme des constituants des huiles essentielles, tandis que les diterpènoïdes C₂₀ constituent le plus grand groupe de métabolites des terpènoïdes chez le genre *Aristolochia*(figure 3). (Matthew *et al.*, 2019 ; Kuo *et al.*, 2012).

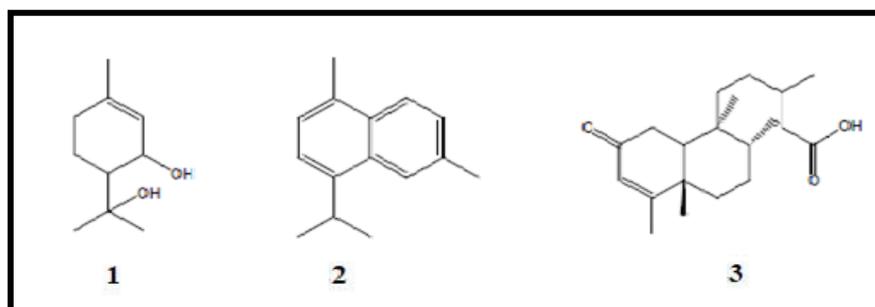


Figure 3: Terpenoïdes du genre *Aristolochia*. (1) : Monoterpenoïdes ;(2) : sequiterpenoïdes ; (3) : diterpenoïdes (Kuo *et al.*, 2012)

1.3.3. Flavonoïdes

1.3.3.1. Structure et classification

Les flavonoïdes sont une classe de composés phénoliques naturels qui comprennent une charpente carbonée C6-C3-C6 (phénylbenzopyrane). Leur structure de base se compose d'un noyau 2-phényl-benzo-c-pyrane comprenant deux cycles benzéniques A et B liés par un hétérocyclicpyrane et un cycle pyrone C (figure 4). Selon le niveau d'insaturation et d'oxydation, les flavonoïdes sont classés en différents sous-groupes, tels que les flavanols, les flavones, les anthocyanidines et les isoflavonoïdes, chalcones, flavonols (figure 4) (Panche *et al.*, 2016)

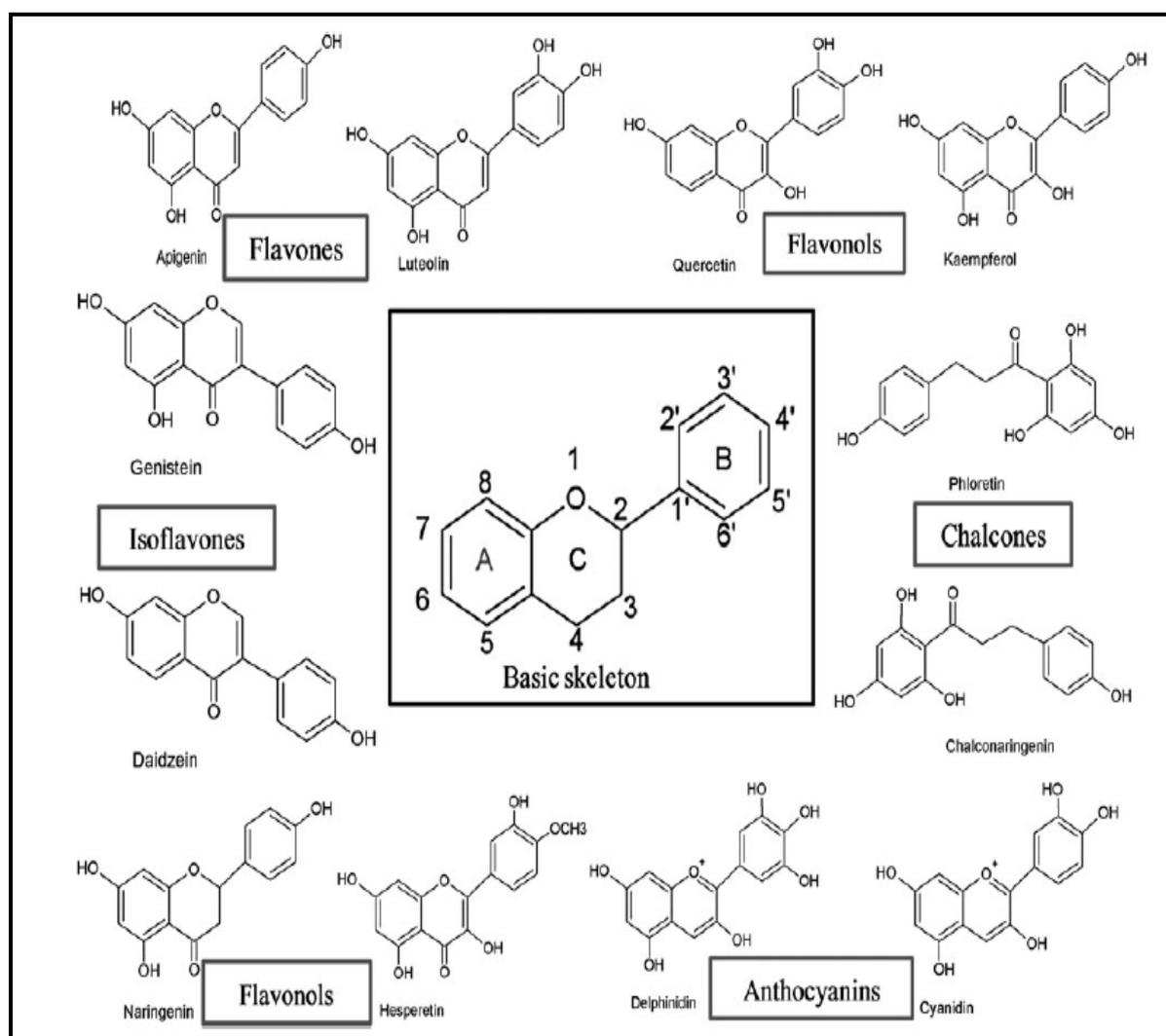


Figure 4 : Structure de base de flavonoïdes et ses classes (Panche *et al.*, 2016)

1.3.3.2. Mécanismes d'actions des flavonoïdes

- **Activité antibactérienne**

Comme les antibiotiques, les flavonoïdes ont des mécanismes d'actions antimicrobiens. Les interactions non spécifiques des flavonoïdes hydrophiles avec les phospholipides membranaires et la formation d'une liaison hydrogène peuvent induire des changements structuraux dans les propriétés de la membrane et moduler indirectement la distribution. De plus, les flavonoïdes capables d'inhiber la synthèse de l'enveloppe cellulaire, des acides gras (FAS-5) et la synthèse des peptidoglycanes. Par ailleurs, l'activité de NADH-cytochrome réductase dans la chaîne respiratoire est également inhibée par les flavonoïdes. Autre activité sur l'inhibition des pompes à efflux, inhibition de la virulence bactérienne (les toxines) et la formation des biofilms a été signalée (Górniak *et al.*, 2018)

- **Activité antioxydante**

L'activité antioxydante des flavonoïdes dépend de la disposition des groupes fonctionnels sur la structure nucléaire. La configuration, la substitution et le nombre total de groupes hydroxyle influent considérablement sur le mécanisme antioxydant. Les flavonoïdes capables d'inhiber les enzymes impliqués dans la génération de ROS et la chélation des oligo-éléments. Par ailleurs, les flavonoïdes peuvent réduire les radicaux libres hautement oxydants (superoxyde, peroxyde, alcoxyde et hydroxyle) par l'inhibition de cycle redox du métal et formation des complexes métalliques insolubles (Shashank et Abhay, 2013)

- **Activité antiinflammatoire et antiallergique**

De nombreux flavonoïdes ont montré des propriétés anti-inflammatoires *in Vivo* et *in Vitro*. Ils sont capables d'inhiber la phospholipase A2 (PLA2), les cyclooxygénases (COX) les lipoxygénases (LOX), l'oxyde nitrique synthétase (NOS), l'enzyme de production d'oxyde nitrique (NO). En effet, l'inhibition de ces enzymes réduit la production d'acide arachidonique (AA), de prostaglandines (PG) et de leucotriènes (LT). On outre, d'autres mécanismes peuvent inclure l'inhibition de la libération d'histamine, la phosphodiesterase, les protéines kinases et l'activation de la transcriptase. (Rathee *et al.*, 2009 ; Pan *et al.*, 2010). Les différents mécanismes de flavonoïdes sont regroupés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Mécanismes d’actions anti-inflammatoires de différents flavonoïdes (Rathee *et al.*, 2009 ; Pan *et al.*,2010)

Flavonoïdes	Mécanismes d’action
Apigénine	Inhibe la synthèse de prostaglandines et la production de IL6,8 et l’activité de IKB kinases
Quercétine	Inhibe la production de NO et l’expression de protéines iNOS
Kaempferol	Inhibe la production de TNF α et la transcription nucléaire de facteur NF-KB
Luteolin	Inhibe l’activité de facteur NF-KB

Dans la pathologie de la polyarthrite rhumatoïdes et l’ostéoporose, les flavonoïdes peuvent réduire le recrutement de cellules inflammatoires (macrophage, cellules T et cellules B), inhiber l’expression de métalloprotéases (MMPs) et activer ou différencier des ostéoclastes. (Figure 5) (Pan *et al.*, 2010)

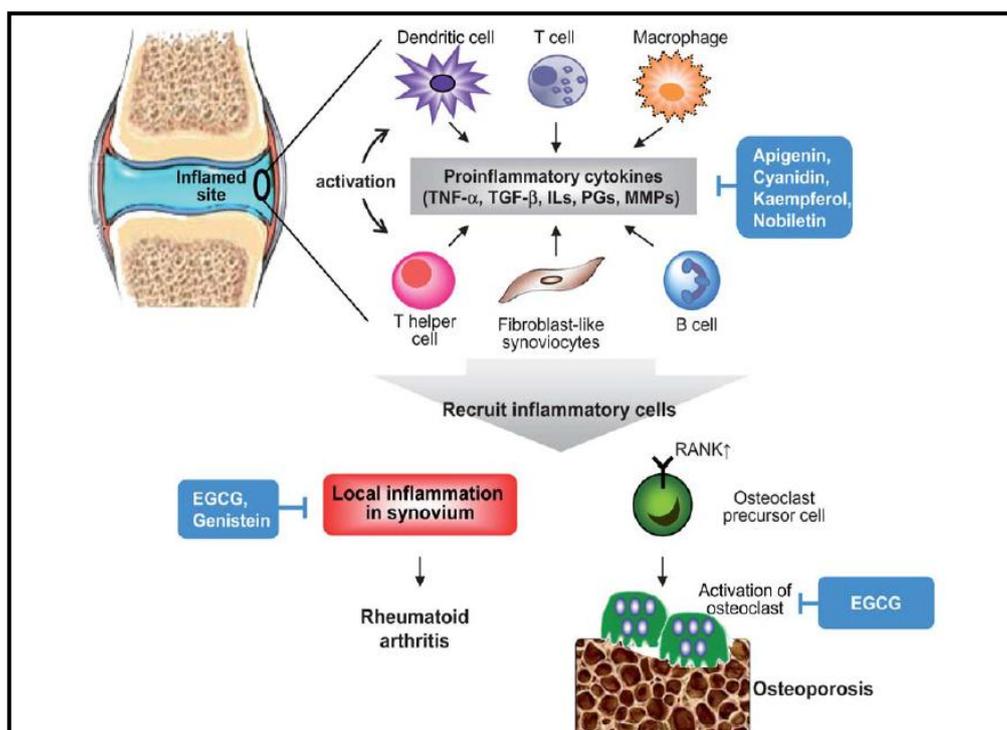


Figure 5 : Mécanismes d’action des flavonoïdes dans la polyarthrite rhumatoïde (Pan *et al.*, 2010)

- **Activité anticancéreuse**

Plusieurs mécanismes d'action des flavonoïdes sur les stades d'initiation et de promotion de la cancérogénicité ont été déterminés. Les flavonoïdes inhibent l'expression de la protéine p53 mutante et conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses dans la phase G2-M et l'activité de la tyrosine kinase. L'effet anticancéreux peut être expliqué par l'inhibition de la production de protéines de choc thermique qui suivent des cellules cancéreuses sous différents stress et forment également un complexe avec p53 mutant (Shashank et Abhay, 2013).

D'ailleurs, la prévention de l'activation métabolique des procarcinogènes est liée à l'interaction des flavonoïdes avec les enzymes de la phase I (les enzymes du cytochrome P450) responsables du métabolisme de divers substrats endogènes ou exogènes, telles que CYP1A1 et CYP1A2. (Kozłowska et Szostak-Węgierek, 2014)

1.3.4 Tanins

Les tanins sont des composés polyphénols hydrosolubles de haut poids moléculaire (500-3000 Daltons). Ils se trouvent principalement dans les plantes, les aliments et les boissons. Ils forment des liaisons hydrogène inter et intramoléculaires capables d'interagir avec les macromolécules et de les précipiter, comme les protéines et les glucides (Smeriglio *et al.*, 2017).

En outre, ils sont solubles dans le glycérol, l'alcool, l'acétone et l'eau. Chimiquement, les tanins peuvent réagir avec sels et sont considérés comme des antioxydants puissants. Les tanins sont classés en fonction de leur structure chimique et de la nature du groupe fonctionnel en deux groupes: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (également appelés proanthocyanidines) (Ghulam *et al.*, 2019).

1.3.4.1. Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des composés contenant un noyau central de glucose ou un autre polyol estifié soit avec l'acide gallique et donne les gallotanins soit avec l'acide ellagique et donne les ellagitanins. La variété de la structure de ces composés est due aux différentes possibilités de formation de liaisons oxydantes. Les réactions d'oxydation intermoléculaires donnent naissance de nombreux composés oligomère de poids moléculaire entre 2000 et 5000 Daltons (Macáková *et al.*, 2014).

Par ailleurs, les propriétés biologiques des tanins liées à la santé peuvent être associées à leurs constituants polyphénoliques, tels que l'acide gallique (Ghulam *et al.*, 2019).

1.3.4.2. Tanins condensés

Les tanins condensés appelés aussi proanthocyanidines. Ce sont les polymères du flavan-3-Ol. Ils sont décrits comme des antioxydants puissants car ils peuvent piéger les radicaux libres et atténuer les dommages associés aux radicaux libres associés (Cai *et al.*, 2016). De plus, ils sont classés selon leur profil d'hydroxylation en plusieurs sous-groupes. Le plus grand sous groupe de proanthocyanidines est formé par les procyanidines. (Macáková *et al.*, 2014)

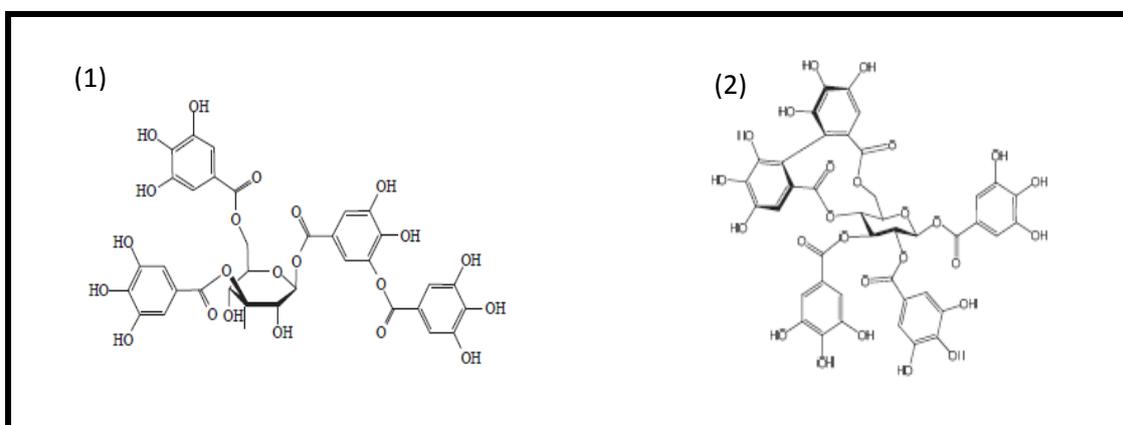


Figure 6 : Structure de tanins hydrolysables (1) et tanins condensés (2)
(Macáková *et al.*, 2014)

1.3.4.3 Activités biologiques des tanins

- **Activité antimicrobienne et antivirale**

Les mécanismes antimicrobiens des tanins facilitent l'inhibition de la croissance des bactéries, ces mécanismes se caractérisent par la capacité non spécifique des tanins de se lier aux enzymes extracellulaires, l'action directe sur le métabolisme des agents pathogènes, l'inhibition de la phosphorylation oxydative et par la formation des complexes avec les ions de métaux de transition, (Macáková *et al.*, 2014). De plus, ces composés phytochimiques peuvent réagir avec les groupes sulfhydryle polypeptidiques de la paroi cellulaire microbienne et provoquent une perte de fonctions membranaires. (Smeriglio *et al.*, 2017)

L'activité antivirale est due à la liaison des tanins sur la surface protéique des virus ou sur la membrane cellulaire des cellules hôtes (Macáková *et al.*, 2014). L'acide ellagique, présente également une activité antivirale spécifique contre le virus de l'hépatite B (HBV) en inhibant la sécrétion de HBeAg dans les cellules infectées par le HBV (Marín *et al.*, 2015).

De plus, il a été démontré que les ellagitannines et plusieurs proanthocyanidines sont des inhibiteurs puissants de la transcriptase inverse (Ekambaram *et al.*, 2016)

- **Activité antioxydante**

L'élimination des radicaux libres, la chélation des métaux de transition et l'inhibition des enzymes prooxydantes, sont les mécanismes de l'activité antioxydante des tanins. Cette propriété antioxydante puissante est due à leur poids moléculaire et leur degré élevé d'hydroxylation des cycles aromatiques. Les tanins diminuent la formation de NO et inhibent l'enzyme nitrique oxyde synthétase (NOS). Ils ont également un effet sur lipoxygénase (LOX). Ils peuvent aussi dommer les lipides membranaires (Macáková *et al.*, 2014).

Une étude a été réalisée par Anam *et al* (2009), montre que les tanins hydrolysables isolés de six espèces du genre *Terminalia* inhibent l'activité de α -glucosidases.

- **Activité antiinflammatoire**

L'activité anti-inflammatoire est l'un des effets importants des tanins. Les mécanismes d'action n'ont pas encore été définitivement résolus en raison du caractère complexe des processus inflammatoires. Plusieurs études ont démontré que les tanins ont des effets inhibitrices sur le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B), et les enzymes responsables à la régulation de l'expression de la COX-2 (Macáková *et al*, 2014). En outre, sept gallotannins ont été isolés de plusieurs espèces d'*Euphorbia sp.* Leur impact sur le métabolisme du NO (stimulation des macrophages LPS) a été observé (Cai *et al.*, 2016)

- **Activité anticancéreuse**

Les activités anticancéreuses des tanins contre diverses cellules cancéreuses ont été étudiées. Ces activités sont dominées par les effets suivants: inhibition de la prolifération, induction de l'apoptose, suppression de l'invasion et l'inhibition de l'angiogenèse. Dans plusieurs types de cellules tumorales, y compris le carcinome hépatocellulaire (CHC), le cancer du sein, la leucémie lymphocytaire, le cancer du poumon et le carcinome épidermoïde, les tanins ont montré un comportement cytotoxique en fonction de la dose et du temps. Des études récentes ont révélé qu'un nombre accru de groupements galloylé de tanins a une efficacité anticancéreuse plus élevée (Cai *et al.*, 2016)

De nombreuses études, ont mis en évidence les mécanismes d'action des proanthocyanidines pour la prévention et le traitement du cancer. Gollucke *et al.*,(2013) a étudié leur propriété anticancéreuse sur les cellules épidermiques de la peau de souris JB6 C141.Ces substances bioactives ont induit une apoptose dépendante de p53 par l'implication des protéines Bax / Bcl-2 et l'activation de la caspase-3.En outre, des effets anti-prolifératifs et proapoptotiques des proanthocyanidines *in vitro* ont également été observés sur le cancer du sein (MCF-7), du côlon (HT-29, HCT116) et la prostate (LNCaP) (Nile et Park, 2014; Skrovankova *et al.*, 2015).

1.4 Présentation de la plante *Aristolochia longa*

1.4.1 Description botanique

Aristolochia longa est une plante vivace, à tige anguleuse, plus ou moins flexueuse pouvant atteindre 80cm; feuilles ovales, triangulaires en cœur, largement ouvert à la base, à nervures apparentes, disposées alternativement sur presque toute la longueur de la tige ; fleurs verdâtres ou jaunâtres rayées de brun ; périanthe soudé en forme de cornet dont le sommet est recourbé en tête de cobra; capsule ellipsoïdale-subglobuleuse (Baba Aissa, 1999).(Figure 7).



Figure 7 : *Aristolochia longa* (photo originale, 2015)

1.4.2 Habitat et localisation géographique

La plante *Aristolochia longa* se trouve en Europe méridional, assez rarement en Espagne et très rarement dans les autres pays. On la trouve également en Afrique du Nord (Cherif *et al.*, 2009)

En Algérie, *Aristolochia longa* croit surtout dans la région centre. On rapporte sa présence, entre autre, au Nord de Setif (Merouani *et al.*, 2017,) aux monts de Chérea de Wilaya de Blida (Cherif *et al.*, 2009 ; Cherif, 2012), en kabylie, au niveau de forêt de Mizrana de la Wilaya de Tizi Ouzou (Bekdouche *et al.*, 2008), à l'Ouest au niveau des monts de Tlemcen (Mesli-bestaoui *et al.*, 2007), à Laghouat (Djeridane *et al.*, 2006)

1.4.3 Systématique et classification : (Nardi, 2009)

Regne : *Plantae*

Division: Tracheophyta

Embranchement : *Magnoliophyta*

Sub-division: Spermatophytina

Classe : *Magnoliopsida*

Super-ordre: *Magnolianaes*

Ordre: *Piperales*

Famille : *Aristolochiaceae*

Genre : *Aristolochia* L

Espece : *Aristolochia Longa* L

Nom français : Aristoloche (Hammiche *et al.*, 2013)

Nom vernaculaire: Berez'tem (Benkhniqne *et al.*, 2014)

Nom Arabe : (الزراوند الطويل) (Ardekani *et al.*, 2011)

1.4.4 Utilisation Thérapeutique

Dans la médecine traditionnelle, le rhizome en poudre de la plante *Aristolochia longa* mélangé avec le miel est utilisé dans le traitement du cancer, le diabète et asthme. Sa décoction est utilisée comme stimulante de l'appétit. (Salhi *et al.*, 2010). Les racines sont également utilisées dans les maladies de «Boumezwi (palpitations de l'aorte)», la constipation et les troubles intestinaux (Bammi et Douira, 2002).

De plus, les racines, en décoction, sont utilisées contre les affections intestinales, les intoxications aiguës et pour provoquer l'avortement chez les femmes (Lahsissene *et al.*, 2009)

Aristolochia longa est une plante antioxydante, analgésique et anti-inflammatoire (Cherif HS *et al.*, 2009, marouani *et al.*, 2017, El Omari *et al.*, 2019.), antimicrobienne (Dhouioui *et al.*, 2016), antifongique (Banerba et Meddah, 2014), antiprotéctive (Derouiche *et al.*, 2017)

L'étude menée par El Omari *et al.* (2019) a confirmé aussi l'activité antidiabétique d'*Aristolochia longa* qui a montré un effet inhibiteur sur les enzymes α -glucosidase et β -galactosidase. Ainsi, l'activité immunomodulatrice a été également évaluée par Benzakour *et al.* (2012).

Banerba *et al.* (2016), Benzakour *et al.* (2012) ont montré que l'extrait aqueux des racines de la plante *Aristolochia longa* a une activité cytotoxique et peut inhiber la croissance de différentes lignées cellulaires cancéreuses.

Chapitre 2

Notions sur l'inflammation

2. Notions sur l'inflammation

2.1. Définition

L'inflammation est un moyen de défense naturelle des organismes supérieurs contre toute agression extérieure (infection, blessure, agression mécanique, etc...). Elle a pour rôle essentiel l'élimination de l'agent pathogène et la réparation du tissu lésé. (Yougbaré-Ziébro *et al.*, 2015).

Le système immunitaire inné est le principal mécanisme de défense contre les micro-organismes envahissants et les cellules cancéreuses, impliquant l'activité de diverses cellules, notamment les macrophages, les mastocytes et les cellules dendritiques. Alors que, le système immunitaire adaptatif implique l'activité de cellules plus spécialisées telles que les cellules B et T qui sont capables d'interagir avec des agents pathogènes et des cellules tumorales en produisant des récepteurs et des anticorps spécifiques (Waisman *et al.*, 2015 ; Azab *et al.*, 2016). L'inflammation peut également survenir en réponse à des processus tels que les lésions tissulaires, la mort cellulaire, l'ischémie et la dégénérescence (Azab *et al.*, 2016).

D'ailleurs, la réponse inflammatoire est déclenchée en deux phases : aiguë et chronique. Chacune est caractérisée par un mécanisme inflammatoire (Abdulkhaleq *et al.*, 2018).

2.2. Inflammation aiguë

Elle se traduit par les quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation ; rougeur, chaleur, tuméfaction et douleur (Rousselet *et al.*, 2005)

L'inflammation aiguë peut être une réponse initiale du corps à des stimuli nocifs (Verma, 2016). Pendant la réponse inflammatoire aiguë, des interactions cellulaires et moléculaires interviennent pour minimiser les blessures ou les infections. Ce processus inflammatoire comprend des changements de la perméabilité vasculaire, le recrutement, l'accumulation de leucocytes, la libération des médiateurs inflammatoires, la restauration de l'homéostasie tissulaire et la résolution de l'inflammation aiguë (Chen *et al.*, 2018)

Les neutrophiles sont les premières cellules attirées par une lésion tissulaire. Elles sont des médiateurs clés de la réponse inflammatoire et programment les cellules présentant l'antigène pour activer les cellules T et libérer des facteurs localisés pour attirer les monocytes et les cellules dendritiques (Chen *et al.*, 2018). Des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine -6 (IL-6), l'interleukine-1 (IL- β), le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), et autres ont été également intervenir (Ashley *et al.*, 2012)

2.3. Inflammation chronique

L'inflammation chronique joue un rôle clé dans l'initiation et la progression des maladies chroniques répandues aujourd'hui, y compris les maladies cardiovasculaires, métabolique et rénales. Bien que les divers processus inflammatoires chroniques puissent sembler, ils impliquent des activités cellulaires et des voies de signalisation similaires.(Manabe,2011). C'est une réponse inflammatoire caractérisée par la présence de cyclooxygénase (COX), la douleur et l'agrégation plaquettaire (Verma ,2016).

Ainsi l'infiltration des cellules inflammatoires dans le site tissulaire, la sécrétion des cytokines inflammatoires et les enzymes responsables à la progression des lésions tissulaires,, la formation de fibrose et de granulome sont les principaux caractéristiques d'une inflammation chronique(Pahwa *et al.*,2020).

La production des cytokines inflammatoires par les leucocytes est nécessaire pour une bonne cicatrisation et la prolifération des cellules épithéliales .Cependant leur sécrétion non contrôlée peut entraîner des troubles inflammatoires. En effet, l'activation du facteur nucléaire Kappa -B « NF-κB » dans divers cellules immunitaires y compris les cellules B, les macrophage, les cellules dendritiques et les neutrophiles conduit à l'expression des cytokines pro- inflammatoires (Prasad et Aggarwal,2014 ; chen *et al.*,2018)

En effet, certains facteurs peuvent induire des réponses inflammatoires chroniques sont également à l'origine de nombreuses maladies chroniques. Ces facteurs comprennent les infections bactériennes, virales et parasitaires, les irritations chimiques et des particules non digestibles. L'inflammation produit des espèces réactives de l'oxygène et des espèces réactives de l'azote qui provoque des dommages oxydatifs et conduisent en outre à des maladies chroniques (Prasad et Aggarwal, 2014).

2.4. Les antiinflammatoires

Le terme antiinflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non stéroïdiens est connue comme traitement actuel de l'inflammation. Ces molécules bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent gêner leur utilisation au long terme (Rahmani *et al.*, 2016).

2.4.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) ou glucocorticoïdes

Ce sont des analogues structuraux d'hormones corticosurrénales (cortisone et cortisol) qui agissent essentiellement au niveau transrationnel après avoir être liés à des récepteurs spécifiques cytosoliques. Les AIS constituent une classe thérapeutique très puissante qui inhibe toutes les étapes de la réaction inflammatoire aussi bien précoces que tardives. Ils contrôlent ainsi les différents stades de l'inflammation : la vasodilatation, l'œdème, la migration des leucocytes, le stress oxydatif et la phagocytose. (Kernouf, 2019)

Les glucocorticoïdes inhibent également l'activation et la différenciation des cellules présentatrices d'antigène (APC) .Ils induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et l'apoptose des basophiles et les lymphocytes T .De plus, ils augmentent l'accumulation de neutrophiles aux sites inflammatoires (Ferrara *et al.*, 2019).

Les AIS représentent le traitement le plus efficace utilisé pour les maladies inflammatoires chroniques tel que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies auto-immune (Mansour ,2015).Néanmoins leurs administration à long terme peut être associé par des effet secondaires de nature endocrinienne, neuropsychiatrique, gastro-intestinale, musculo-squelettique, cardiovasculaire, dermatologique, oculaire ou immunologique (Oray *et al.*, 2016).

2.4.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques largement utilisés en raison de leurs effet antalgiques, anti-pyrétique et anti-inflammatoires (Mc Gettigan et Henry, 2013 ; Fokunang *et al.*, 2018). Ainsi, Ils peuvent réduire l'érythème, la température élevée et la douleur provoquée par une variété de stimuli inflammatoire (Jahnavi *et al.*, 2019).

Le mécanisme d'action des AINS, est principalement obtenu par l'inhibition de l'activité enzymatique de cyclo-oxygénases COX-1 et COX-2 et par conséquent l'inhibition de la biotransformation de l'acide arachidonique en prostaglandines. Cependant, l'administration de ces médicaments doivent être prescrits pour une courte durée à une dose efficace et plus faible avec une surveillance attentive de la toxicité gastro-intestinale, rénale et cardiovasculaire (Jahnavi *et al.*, 2019).

2.4.3. Les antiinflammatoires naturels

Les produits d'origine naturelle occupent une place importante dans la découverte de nouveaux médicaments. On estime que près de 50% des agents thérapeutiques utilisés actuellement proviennent de sources naturelles (plantes, champignons, animaux, algues, etc.), et moins de 10% des espèces végétales ont été étudiées pour leurs activités biologiques (Balunas et Kinghorn, 2005). En effet, plusieurs études ont montré que des composés bioactifs ont des propriétés antioxydantes ; antiinflammatoires et anticancérigènes. De plus, ils peuvent être des protecteurs contre diverses maladies chroniques y compris les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète (Aanchal *et al.*, 2019).

2.4.3.1. Les antiinflammatoires naturelles non végétales

Plusieurs travaux ont été portés sur l'étude de l'effet antiinflammatoire de champignons et de miel. L'étude menée par Lindequist *et al.*, (2005) a été effectuée sur quatre champignons différents. *Phellinus linteus*, *Ganoderma lucidum* (champignon Lingzhi), *Pleurotus pulmonarius* et *Grifola frondosa*. En effet, quatre acides ganodériques (classe de triterpénoïdes) ont été isolés de *G. lucidum* ont une activité anti-inflammatoire. Elsayed *et al.* (2014), a montré que les terpénoides (cyathines) sont responsables à la réduction des taux d'IL-1 β , IL-6, LTs, PGs et TNF- α , et à l'inhibition de l'activité de COX-2, iNOS et NF κ B.

Par ailleurs, Yaghoobi, R. *et al.* (2013) et Vallianou, N.G (2014), ont démontré que les propriétés antiinflammatoires du miel se caractérisent par la réduction de la production de TNF- α , l'inhibition de l'activité de COX-2, la translocation de NF κ B vers le noyau et l'augmentation de la production de NO.

2.4.3.2. Les antiinflammatoires d'origine plantes médicinales

Le développement des médicaments, à base de plantes standardisés dont l'efficacité et la sécurité d'utilisation éprouvée, est une alternative importante pour généraliser la médication et offrir de nouvelles options thérapeutiques (Abudunia, 2018)

L'utilisation d'une partie ou extrait des plantes médicinales comme composés anti-inflammatoires est connue depuis l'antiquité. Elles sont considérées comme une source de nouvelles molécules avec plusieurs activités biologiques, notamment l'activité antiinflammatoire (Mohammadi, 2013)

De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence l'activité anti-inflammatoire de différentes parties de plantes médicinales. Certains extraits ont montré une activité anti-inflammatoire importante. L'extrait aqueux de caroube mûre (*Ceratonia siliqua*) est parmi les remèdes les plus utilisés en médecine traditionnelle arabe. L'extrait filtré est évaporé en une pâte visqueuse et sucrée, cette pâte possède une activité contre les inflammations de la bouche (Rtibi *et al.*, 2016 ; Rtibi *et al.*, 2016).

Lamkinsi *et al.* (2016) a démontré que l'extrait méthanolique de *Ceratonia siliqua* exerce une action anti-inflammatoire importante par une réduction significative de la formation de l'œdème à une concentration de 200mg/kg comparables à celles de l'indométhacine.

Une activité anti-inflammatoire réductrice de l'œdème induit par la carragénine a été observée après l'administration orale de l'extrait méthanolique des feuilles de *Pistacia atlantica* Def (Amri *et al.*, 2018)

Traoré *et al.*, 2019 a mis en évidence l'action inhibitrice de l'extrait aqueux et l'éthanolique des racines de *Balanites aegyptiaca* sur l'activité enzymatique de cyclooxygénase (COX-1, COX-2), 5-lipoxygénase (LOX) et phospholipase (sPLA₂), responsables de la synthèse des prostaglandines et thromboxane.

Par ailleurs, nombreuses classes de composés bioactifs ont été explorées au cours des deux dernières décennies avec une activité anti-inflammatoire importante. Les flavonoïdes (les kaempférols), les terpénoïdes, les alcaloïdes, les stilbénoloïdes sont les principales classes de composés ayant une activité inhibitrice puissante des isoenzymes COX-1 et COX-2. (Attiq *et al.*, 2018).

2.5. Polyarthrite Rhumatoïde

C'est une maladie inflammatoire touchant l'articulation synoviale (la diarthrose). Une articulation est la jonction entre un ou plusieurs os ; son rôle est de relier les os entre eux et conférer une certaine mobilité (Garnier, 2004).

Une articulation saine est composée d'un cartilage, une membrane synoviale et un liquide synovial

2.5.1. Articulation synoviale saine

Est une articulation mobile composée de deux os ou plus comportant chacun un cartilage articulaire (cartilage hyalin), un cartilage calcifié, un os sous-chondral et un os spongieux sous-jacent, une membrane synoviale, un liquide synovial, une capsule articulaire, parfois des ligaments et d'un ou deux ménisques fibrocartilagineux (Dubois, 2015).

2.5.1.1. Cartilage articulaire (cartilage hyalin)

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif spécialisé, d'origine mésenchymateuse, non vascularisé et non innervé. Il assure, grâce à ses propriétés de résistance aux forces de compression et à son élasticité, le glissement entre les surfaces osseuses et l'amortissement des pressions dues au mouvement en condition physiologique. Son activité est principalement régulée par le stress inflammatoire et le stress mécanique. (El Hayek *et al.*, 2014)

2.5.1.1.1. Matrice extracellulaire (ECM)

- **Le Collagène**

Le collagène est la macromolécule structurelle la plus abondante dans l'ECM, il représente environ 60% du poids sec du cartilage. Le collagène de type II représente 90 à 95% du collagène dans l'ECM et forme des fibrilles et des fibres entrelacées avec des agrégats de protéoglycanes.. Il est impliqué dans la minéralisation du cartilage. Il se dépose sous la forme d'un tapis uniquement autour des chondrocytes du cartilage calcifié et des chondrocytes hypertrophiques .Les types de collagène I, IV, V, VI, IX et XI sont également présents mais ne contribuent qu'à une proportion mineure. Ces collagènes aident à former et à stabiliser le réseau de fibrilles de collagène de type II. (Fox *et al.*, 2009).

Tous les types du collagène constituent de 3 chaînes polypeptidiques (chaînes α) enroulées en triple hélice. Chaque chaîne polypeptidique constitue principalement par deux acides aminés, la glycine et la proline, l'hydroxyproline assure la stabilité des liaisons hydrogène. La structure en triple hélice des chaînes polypeptidiques confère la stabilité de la matrice extracellulaire (Fox *et al.*, 2009).

- **Eau**

L'eau existe sous forme libre et liée aux protéoglycanes. L'eau liée confère au tissu sa consistance élastique et l'eau libre véhicule les substances nutritives et les déchets métaboliques. L'interaction entre l'eau et les macromolécules de la matrice influence les propriétés mécaniques du tissu (Laurent, 2003). L'écoulement d'eau à travers le cartilage et la surface articulaire aide à transporter et à distribuer les nutriments aux chondrocytes (Fox *et al.*, 2009).

- **Proteoglycanes**

Les protéoglycanes insérés dans la membrane plasmique des chondrocytes, peuvent aussi servir de lien entre la cellule et la matrice extracellulaire (Bemfield *et al.*, 1992). Ils représentent 10 à 15 % du poids humide du cartilage (Galois, 2003). Ce sont des macromolécules des structures complexes formées d'une protéine centrale "core protein" sur laquelle se fixent d'une manière covalente des chaînes de glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs). Les GAGs sont des molécules disaccharidiques (la chondroïtine sulfate (type 4 et type 6) et la kératine sulfate). Les protéoglycanes sont ensuite associés à l'acide hyaluronique (un GAG non sulfaté) de manière non covalente, dans la région Nterminale de la protéine centrale, par des protéines de liaison 'link protein' (Chevalier et Richette, 2005).

- **Protéines non collagènes et les glycoprotéines**

Les glycoprotéines sont aussi appelées 'glue intercollagénique' car elles permettent l'assemblage et l'adhésion des fibres de collagène entre elles, les liaisons protéoglycanes-collagène et l'interaction des chondrocytes avec la matrice. Parmi ces protéines on trouve la chondroadhérine, l'anchoring CII, les thrombospondines, les protéoglycanes riches en leucine : la décorine, le biglycane, les perlecanes, etc et la cartilage *oligomeric matrix protein* (Pollet, 2018).

2.5.1.1.2. Chondrocytes

Les chondrocytes sont les seules cellules du cartilage, varient en nombre, en forme et en fonction de la couche de la plaque cartilagineuse. Ils mesurent entre 30 à 40 µm de diamètre. Ils sont responsables de la production, l'organisation et de la maintenance de la MEC. Ils reçoivent des signaux mécaniques et physicochimiques transmis par la matrice extracellulaire. Ils possèdent la machinerie nécessaire de l'anabolisme (synthèse des constituants) et au catabolisme (dégradation de la MEC). (Bhosale et Richardson, 2008).

Ces processus comprennent la synthèse de protéines matricielles (collagène de type II, protéoglycanes et protéines non collagéniques), de protéases, d'inhibiteurs de protéases, de facteurs de transcription, inflammatoire et de croissance (Bhosale et Richardson, 2008 ; Noble *et al.*, 2010).

Dans le cas d'une pathologie, les chondrocytes synthétisent des cytokines antiinflammatoires provoquant la destruction du cartilage par l'augmentation de l'activité des métalloprotéinases, de hyaluronidases et d'une ou des agrécannases (Galois, 2003).

Dans une polyarthrite rhumatoïde, de multiples médiateurs inflammatoires sont présents dans l'articulation synoviale. D'une part, les chondrocytes agissent comme des cellules cibles de ces médiateurs inflammatoires, d'autre part, les chondrocytes de la PR agissent également comme des cellules effectrices, présentant diverses altérations qui facilitent directement ou indirectement les lésions articulaires de la PR (Tseng *et al.*, 2020)

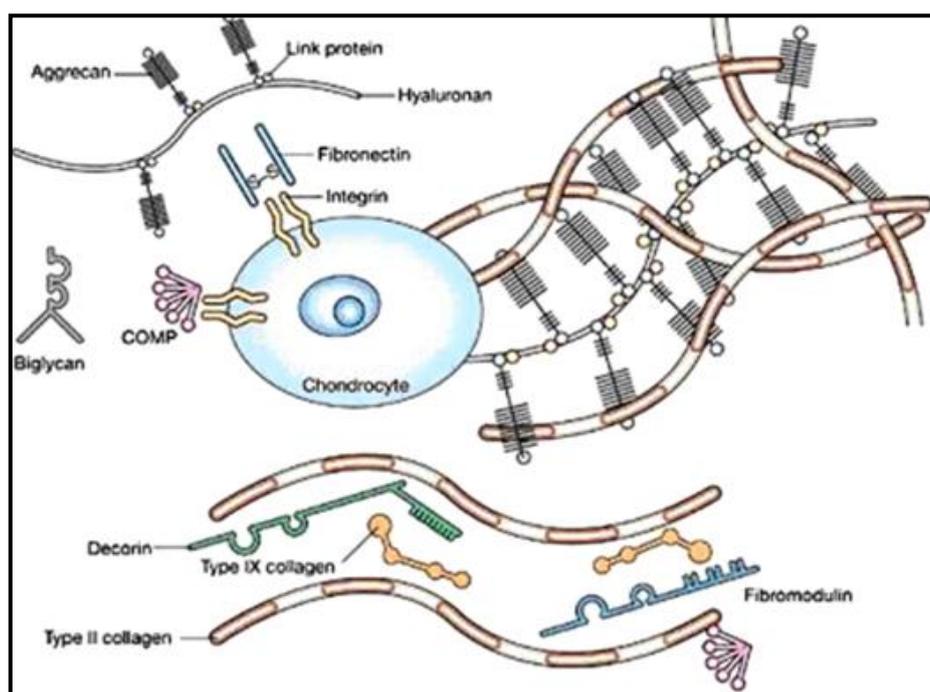


Figure 8 : Schématisation de la relation entre la cellule et la matrice extracellulaire du cartilage : collagènes, protéoglycanes et molécules non collagéniques. (Fox *et al.*, 2009).

2.5.1.2. La membrane synoviale

La membrane synoviale ou synovium est un tissu conjonctif d'origine mésenchymateuse qui recouvre toute la surface interne de l'articulation à l'exception de la surface du cartilage. Le synovium joue un rôle dans la protection et le maintien de l'intégrité du cartilage articulaire. Les synoviocytes de type A jouent un rôle dans la résorption de la synovie et des déchets éventuels. Tandis que les synoviocytes B permettent l'élaboration de l'acide hyaluronique et la synthèse des molécules pro-inflammatoires telles que des métalloprotéines, des radicaux libres, des cytokines (IL1, TNF α) (Dubois, 2015).

Toutefois, l'acide hyaluronique confère à la synovie une viscosité importante et son état de gel, il est considéré comme le composant responsable des propriétés rhéologiques du liquide synoviale (Noble *et al*, 2010)

2.5.1.3. Le liquide synovial (LS)

Le liquide synovial, parfois appelé synovie, est un dialysat modifié, proche du plasma mais moins riche en protéines et en cellules (absence de globules rouges). Il assure la nutrition des cartilages hyalins et la lubrification des surfaces articulaires (Dubios, 2015)

2.5.2. La physiopathologie de Polyarthrite Rhumatoïde (PR)

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune inflammatoire systémique chronique caractérisée par une inflammation articulaire persistante entraînant des lésions cartilagineuses et osseuses. Cette destruction est liée à la présence d'un auto-antigène, l'activation des cellules T et B antigènes spécifiques et la production de cytokines inflammatoires. Ces facteurs conduisent l'apparition d'une synovite, prolifération de la synovie et du cartilage et destruction osseuse sous-chondrale. (Calabresi *et al*, 2018)

La PR peut également impliquer des organes extra-articulaires, principalement la peau, les poumons, les yeux et le système cardiovasculaire. La progression de la maladie peut entraîner une perte de fonctionnalité, réduire la qualité de vie et accroître la morbidité et la mortalité

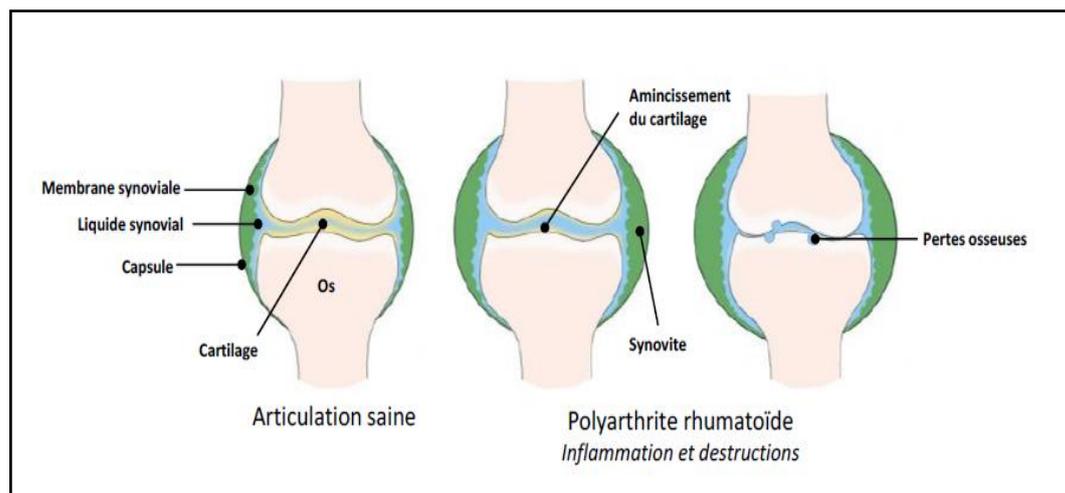


Figure 9 : Schéma du développement de Polyarthrite Rhumatoïde (Boutet, 2016)

2.5.2.1. Phase d'initiation

Le premier événement à l'origine de la synovite serait une réponse inflammatoire « non spécifique » à un stimulus encore non identifié. Les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les mastocytes, les polynucléaires neutrophiles sont attirés dans la membrane synoviale par des chimiokines telles que le monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) et l'interleukine-8 (IL-8) (Totoson, 2015). Ces cellules seront par la suite à l'origine de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. Cette production de cytokines spécifiques initie l'inflammation et par la suite la dégradation de l'os et du cartilage (Gerhard, 2014).

On tend actuellement à incriminer des autoantigènes situés dans l'articulation (collagène de type II, proteoglycanes, protéines de la matrice) ainsi que des peptides d'origine exogène, issus de bactéries ou de virus. (Totoson, 2015)

2.5.2.2. Phase de recrutement et inflammation

La réaction lymphocytaire CD4⁺ induit une réponse immunitaire de type Th1 à forte production de cytokines inflammatoires (IFN γ , IL-2, et IL-17) et active les lymphocytes B en plasmocytes qui produisent diverses immunoglobulines dont notamment les facteurs rhumatoïdes (FR) et les anticorps anti-CPP. Les lymphocytes B participent ainsi à la présentation antigénique, à l'interactivation des lymphocytes T, et à la production de cytokines pro-inflammatoires. (Gerhard, 2014 ; Totoson, 2015)

2.5.2.3. Phase de prolifération synoviale (Pannus) et destruction articulaire

L'érosion et la destruction articulaire constituent l'étape terminale du mécanisme physiopathologique de la PR. Les cytokines proinflammatoires participent à cette destruction articulaire (synovite) induisent la synthèse de facteurs de croissance nécessaires à la prolifération de la membrane synoviale, et la production de métalloprotéases par les synoviocytes (Culioli, 2016). Ainsi, Les cytokines pro-inflammatoires entraînent une multiplication anormale des cellules de la membrane synoviale et un épaissement de celle-ci on parle alors de pannus synovial (Benefriha, 2018)

Une fibrose articulaire, a lieu parallèlement à la phase de destruction articulaire, sans pouvoir la compenser. Les facteurs de croissance comme le TGF β (Transforming Growth Factor β) induisent la synthèse de collagène et de protéoglycanes par les chondrocytes. L'IL10 et le TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloprotease) inhibent la libération des métalloprotéases par les synoviocytes (Sany, 2003)

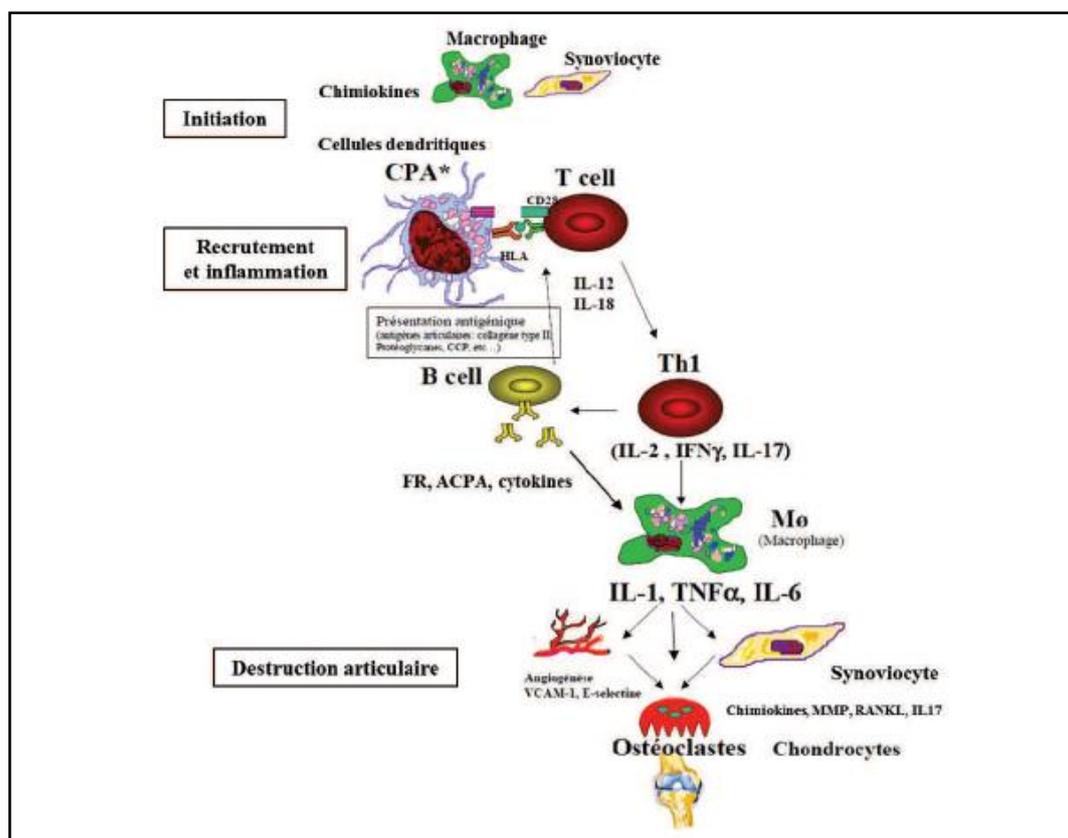


Figure 10 : Schéma général récapitulatif de la physiopathologie de la PR (Morel et Combe, 2004)

2.5.3. Diagnostic de la poly arthrite rhumatoïde

2.5.3.1. Examen clinique

A la phase initiale, il est important de confirmer l'existence d'arthrite ou de synovite correspondant à une PR, après avoir éliminé les autres rhumatismes inflammatoires. Il convient ensuite de rechercher des éléments pronostiques d'une évolution chronique et destructive de cette polyarthrite (Totoson, 2015).

Cliniquement, L'inflammation synoviale se manifeste par un enraidissement douloureux articulaire, maximal le matin. Ces signes sont une limitation de la mobilité articulaire, avec déclenchement d'une douleur quand on tente de forcer le mouvement (Diarra, 2008), et apparition d'une tuméfaction des articulations donnée par une synovite et un pannus synovial (Mbiantcha *et al*, 2017).

La PR est caractérisé par un gonflement douloureux de plusieurs articulations correspondant à une inflammation de la membrane synoviale (synovite) entraînant une destruction cartilagineuse et osseuse et à terme des déformations des articulations (Boutet, 2016)

2.5.3.2. Examen Biologique

Le bilan biologique s'attachera à rechercher et à confirmer un syndrome inflammatoire avec le dosage de plusieurs paramètres. Le tableau 2 représente les examens biologiques systématiques réalisés lors d'une suspicion de PR.

En général, un syndrome inflammatoire est observé avec une augmentation de sédimentation de la CRP, tandis que FR représente un facteur de mauvais pronostic. Les anticorps anti-peptides citrullinés (ou anti-CCP) sont très intéressants pour le diagnostic précoce des polyarthrites rhumatoïdes et constitue aujourd'hui le test le plus fiable et spécifique de la PR (Totoson, 2015). Une recherche d'anticorps antinucléaires (ou ACAN) est également effectuée au début de maladie pour éliminer les diagnostics différentiels. (Radideau *et al*, 2010)

Tableau 2 : Examens biologiques systématiques réalisés lors d'une suspicion de PR (Culioli, 2018)

Examens biologiques systématiques réalisés devant une polyarthrite rhumatoïde débutante
Hémogramme
Vitesse de sédimentation (VS) et protéine C-réactive (CRP)
Transaminases
Créatininémie ; bandelette urinaire (protéinurie, hématurie)
Facteurs rhumatoïdes (FR) et anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (anti-CCP)
Anticorps antinucléaires (ACAN)
Sérologies virales : hépatite B et C (en bilan préthérapeutique)

2.5.3.3. Examens radiologiques

Le bilan radiographique initial est utile comme point de référence initial. Des modifications radiographiques spécifiques n'apparaissent que plus tard, lorsque le pannus aura progressivement détruit les structures articulaires. On note parfois sur les radiographies une tuméfaction des parties molles ou une simple déminéralisation épiphysaire «en bande» métacarpo-phalangienne qui n'est pas spécifique, (Diarra, 2008).

L'imagerie IRM est sans doute l'examen d'imagerie le plus sensible pour dépister les géodes et l'oedème inflammatoire épiphysaire. Tandis que l'échographie avec doppler puissance permet à moindre frais de détecter les synovites actives et les érosions débutantes (Mazières *et al.*, 1999 ; Totoson, 2015)

2.5.3.4. Examen de liquide synovial

Au cours de la polyarthrite rhumatoïde, le liquide de type inflammatoire, riche en cellules, avec essentiellement des polynucléaires neutrophiles peut être analysé. Parfois, la formule est à prédominance lymphocytaire. Le dosage du complément ou des autoanticorps dans le liquide articulaire n'est pas utile en pratique quotidienne (Visser, 2003). Par contre, la biopsie synoviale est envisageable, pour éliminer une origine infectieuse dans les monoarthrites (Totoson, 2015).

2.5.4. Traitement médicamenteux de PR

Dans le but de prévenir et limiter les lésions articulaires de la PR qui pouvant être irréversibles, plusieurs outils médicamenteux plus performants à la démonstration scientifique sont mis à disposition, ce qui a conduit à de nouvelles stratégies thérapeutiques et à des objectifs plus ambitieux. (Combe, 2004)

Parmi les nouveaux outils, on cite les traitements de fond comme le léflunomide, le Méthotrexate, l'utilisation des associations thérapeutiques comme les anti-TNF α . (Combe, 2008 ; Hayde, 2011). Le tableau représente les différents traitements suivis dans la prise en charge thérapeutique de la PR

Tableau 3 : Différents traitements suivie dans la prise en charge thérapeutique de la PR (Benfriha, 2018)

Types de traitement	Médicaments	
Traitements symptomatiques	Les antalgiques de Niveau I et II	Paracetamol, Aspirine
	Les antiinflammatoires non stéroïdiens conventionnels	Acéclofénac CARTREX® Diclofénac VOLTARENE® Ibuprofène BRUFEN® Piroxicam FELDENE® Sulindac ARTHROCINE®
	Les Cox2	Célécoxib CELEBREX® Etoricoxib ARCOXIA®
	Les glycocorticoïdes	Prédnisolone SOLUPRED® Prédnisone CORTANCYL®
Traitements de fond (classiques)	Les Anglo-saxon « DMARDs »	Méthotrexate (MTX) IMETH®, METOJECT®, NOVATREX®
	Les antipaludéens de synthèse	Chloroquine NIVAQUINE® Hydroxychloroquine PLAQUENIL®
	Autres médicaments immunosuppresseurs	Azathioprine IMUREL® Léflunomide ARAVA®
Traitements locaux	Infiltrations péri ou intra-articulaires de corticoïdes	Etaméthasone BETNESOL®, CELESTENE®, DIPROSTENE®
Traitements biologiques	Ac monoclonaux anti-TNF α	Adalimumab HUMIRA®, Certolizumab pégol CIMZIA® Etanercept ENBREL®
	récepteurs solubles de la cytokine	Anakinra KINERET® Rituximab MABTHERA®

Chapitre 3

Formes galéniques en
phytothérapie

3. Formes galéniques en phytothérapie

3.1. La phytothérapie

La phytothérapie est l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques. Elle est utilisée à travers le monde en tant que médecine alternative et complémentaire (Bellamine ,2017) D'ailleurs, la phytothérapie est destinée à prévenir ou à traiter certains troubles fonctionnels mineurs ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes, qu'elles soient consommées ou utilisées par voie externe (Bellamine ,2017)

Nombre de plantes contiennent des principes actifs qui peuvent avoir les mêmes propriétés que des médicaments de synthèse. Les plantes médicinales sont faciles à utiliser, seraient potentiellement efficaces et peu coûteuses. Le mode de préparation et d'administration sont des facteurs déterminants dans un traitement (Kandouli, 2018).

L'extraction des principes actifs permet par la suite d'isoler et d'adapter des formes galéniques aux différentes molécules présentant des propriétés thérapeutiques. La richesse de la phytothérapie réside essentiellement dans la complexité des modes d'action des nombreux principes actifs retrouvés dans les différents extraits de plantes (Kirassian , 2015)

3. 2. Les Formes galéniques à base de plantes

Plusieurs formes galéniques sont préparées a partir des plantes ou de leurs principes actifs. Ces formes peuvent être administrées sous forme des tisanes, des teintures, des capsules, des comprimés, des huiles essentielles, ...etc. En effet, de nombreuses techniques de préparations médicamenteuses à base des plantes médicinales ont été également développées. Par ailleurs, la connaissance de la composition et les caractéristiques physicochimiques des principes actifs nous permet d'établir la meilleure méthode d'extraction et une administration appropriée afin d'obtenir l'effet recherché (Capasso *et al*, 2003)

3.2.1. Formes solides

3.2.1.1. Gélules

Les gélules désignent une forme galénique de médicament, solide, que l'on avale. Elles sont constituées d'une enveloppe dure et creuse, qui contient le principe actif. Les gélules de poudres de plantes obtenues par pulvérisation de la drogue végétale entière séchée, permettent une biodisponibilité de tous les principes actifs de la drogue végétale, son action pharmacologique est engendrée par la totalité des constituants de la drogue végétale. Alors que les gélules d'extrait sec constituent d'une concentration plus élevée en principes actifs dans chaque gélule (Limonier, 2018).

3.2.1.2. Capsules

Les capsules sont définies comme étant des préparations de consistances solides constituées par une enveloppe gélatineuse dure ou molle, contenant généralement une unité de prise d'une substance active. Ces substances peuvent être solides ou liquides, leur contenu est constitué par un ou plusieurs principes actifs médicamenteux additionnés, ou non d'excipients tel que solvants, diluants, lubrifiants, désagrégeant. (pharmacie galénique, 2008) Elles peuvent être de formes diverses (oblongues, ovales, sphériques) et de différentes couleurs. (Chabrier, 2010)

3.2.1.3. Comprimés

Ils sont préparés à partir d'extraits secs ou de poudres de plantes, tout comme les gélules, et sont additionnés de diluants, liants, lubrifiants, aromatisants et colorants. D'ailleurs pour obtenir des comprimés de qualité satisfaisante, les poudres de plantes subissent souvent des procédés de granulation, cryodessiccation ou d'extrusion. L'avantage principal des comprimés tient dans leur solidité et leur résistance à la lumière. Ainsi le risque d'altération du principe actif est moindre, d'autant plus que les comprimés sont souvent dragéifiés afin de masquer toute saveur désagréable (Limonier, 2018).

La forme déshydratée de comprimés permet le contact de substances incompatibles en milieu hydraté, elle assure également une bonne protection et conservation des principes actifs. De plus la taille réduite facilite leur administration par voie orale. (Pharmacie galénique, 2008)

3.2.2. Formes liquides

3.2.2.1. Tisanes

Les tisanes sont des préparations aqueuses. Elles peuvent être préparées avec des drogues végétales. Ces drogues doivent être divisées pour être plus facilement pénétrées par l'eau. Les tisanes sont préparées avec de l'eau potable. Selon les parties des plantes utilisées, et la nature entrant dans leur composition, différents procédés de préparations peuvent être administrés. On peut distinguer l'infusion, la décoction, la macération et la digestion. Les parties fragiles des plantes (fleurs, feuilles) sont préparées par infusion ou digestion, tandis que, les parties plus dures ou ligneuses (tiges, racines, grains) sont préparées par décoction ou macération (pharmacie galénique,2008).

3.2.2.2. Hydrolats

Ce sont des préparations aqueuses renfermant la plupart des principes volatils, solubles dans l'eau. Ils sont obtenus par distillation d'une drogue fraîche à l'aide d'un alambic, ce sont en fait les composants secondaires recueillis après hydrodistillation lors de la préparation des huiles essentielles (Raynaud, 2006)

3.2.2.3. Teintures

Elles sont définies comme étant des préparations liquides généralement obtenues par extraction hydroalcoolique de la drogue fraîche séchée. Le titre alcoolique est compris entre 0 et 90° en fonction de la nature de la substance à dissoudre (Bellamine, 2017).

3.2.2.4. Extraits fluides

Ces préparations sont obtenues soit par macération puis filtration, soit par percolation d'une matière première végétale sèche dans l'alcool ou l'eau. Quel que soit le procédé choisi, il est systématiquement suivi par évaporation sous vide du solvant d'extraction. Ces extraits ont l'avantage d'être très concentrés, avec une quantité importante de principes actifs pour un petit volume. Les processus d'extraction les plus récents ne font pas appel à la chaleur, mais sont réalisés sous pression réduite. Ce mode opératoire réduit le risque de dénaturation des molécules extraites. Par contre, leur conservation est limitée à cause du risque de précipitation des tanins. (Lebreton, 2014)

3.2.2.5. Macérats glycinés

Les macérats glycinés font partie de la gemmothérapie, utilisent souvent les bourgeons (jeunes pousses d'arbres), ces produits sont préparés à base d'alcool et de glycérine en quantités égales et peuvent être conservés pendant trois ans (Kirassian, 2015).

3.2.2.6. Extraits de Plantes fraîches Standardisées "Les EPS"

Les EPS sont obtenues par cryobroyage de plantes fraîches congelées, pressage afin de récupérer les principes actifs hydrophiles, puis lixiviation avec de l'alcool et sous vide à basse température pour récupérer les principes actifs lipophiles. Ensuite l'alcool est éliminé par évaporation, Un mélange eau (15%)/glycérol (85%) est ajouté afin d'obtenir un soluté liquide. Ce procédé permet d'obtenir un extrait contenant la totalité des principes actifs de la plante fraîche dont il est issu. Les EPS respectent la notion de *Totum* puisque l'ensemble des PA hydrophiles et lipophiles sont extraits, et conservés dans leur intégrité (Lebreton, 2014).

3.2.2.7. Sirops

Ce sont des préparations aqueuses sucrées et de consistance visqueuse. Ils sont composés par un ou plusieurs principes actifs, des substances auxiliaires (colorants, aromatisants) et agents antimicrobiens. Ils sont préparés par le saccharose qui assure une protection antimicrobienne. Dans les préparations pharmaceutiques, le saccharose peut être remplacé par du glucose, du fructose, de sucre inverti ou d'autres composants telle que les polyols de saveur sucrée (glycérol, sorbitol, xylitol,...), d'édulcorants artificiels et d'épaississants pour atteindre une viscosité voisine de celle du sirop de saccharose (Toé, 2004).

3.2.3. Formes pour usage externe

3.2.3.1. Préparations huileuses

Les huiles végétales qui sont obtenues par expression (huile) ou macération (macérat huileux), sont considérées comme une base de préparations huileuses. Les huiles végétales sont d'excellents véhicules pour les huiles essentielles. Ces préparations sont choisies en fonction de leurs qualités de véhicule ou leur action propre. (Limonier, 2018)

3.2.3.2. Gels

Les gels sont des préparations de consistance molle, ils proviennent du mélange entre des substances colloïdales et un liquide aqueux ou alcoolique. Pour un usage phytothérapie, on peut les obtenir à partir d'une pommade, à laquelle on ajoute un ou plusieurs extraits hydroglycoliques.(Chabrier, 2010).

3.2.3.3. Crèmes

Les crèmes sont des préparations émulsionnées multiphasées de consistance molle préparées à partir de substances grasses associées à un milieu aqueux grâce à l'addition d'un émulsif. Selon la nature de l'émulsion, on distingue des crèmes (Eau dans Huile) ou (Huile dans Eau). (Lompo, 1999).

3.2.3.4. Pommades

Les pommades sont des préparations semi-solides de consistance molle, obtenues par le mélange d'une substance médicamenteuse avec un excipient approprié, elles sont appliquées sur la peau soit dans le but d'administrer des médicaments par voie dermique, ou pour obtenir une action superficielle. (Dembélé, 2011). Cette préparation doit être appliquée sur la peau et/ou les muqueuses afin d'exercer une action locale ou systémique par la pénétration des principes actifs à travers la peau (Muther ,2015). D'autres agents peuvent être ajoutés à la préparation des pommades comme des agents antimicrobiens, des antioxydants, des agents stabilisants, émulsifiants ou épaississants.(Toé,2004)

3.2.3.4.1. Classification des pommades

Selon la nature de l'excipient, on définit les types de pommades suivants (Pharmacopée Européenne ,2014) :

-Les pommades hydrophobes ou lipophiles

Ces pommades hydrophobes ne peuvent absorber que de petites quantités d'eau. Les excipients les plus communément employés pour leur formulation sont la paraffine solide, la vaseline, la paraffine liquide, la paraffine légère, les huiles végétales, les graisses animales, les glycérides synthétiques, les cires et les polyalkylsiloxanes liquides.(Pharmacopée Européenne ,2014)

-Les pommades hydrophiles

Ce sont des préparations dont les excipients sont miscibles à l'eau. Ces excipients sont habituellement constitués des mélanges de macrogols (polyéthylène glycols) liquides et solides. Elles peuvent contenir des quantités appropriées d'eau (Pharmacopée Européenne, 2014)

-Les pommades absorbant l'eau

Dans ce type de préparation, les pommades peuvent absorber des quantités plus importantes d'eau. Selon la nature des émulsifiants et après une homogénéisation, la propriété d'absorbance conduit à l'obtention d'émulsions eau-dans-huile(E/H) ou huile dans-eau (H/E). Généralement, les excipients utilisés sont ceux d'une pommade hydrophobe (Pharmacopée Européenne, 2014)

3.2.3.4.2. Formulation des pommades

La formulation à base des pommades est composée de :

-Principe actif

Le principe actif, est le ou les composants qui vont avoir un effet thérapeutique. Ils sont destinés à traiter ou à prévenir une maladie ; leur dosage est réalisé en fonction de la puissance de leur action, de leur disponibilité dans l'organisme et de la tolérance du sujet vis-à-vis de cette action. D'ailleurs, leur fonction est dépend à sa solubilité dans l'eau qui oriente le choix de la forme d'administration et sa stabilité vis à vis de la température et l'humidité (Le Hir *et al*, 2009).

-Excipient

On appelle excipient, tout composant que le(s) principe(s) actif(s) permet la dissolution et la dispersion d'un ou plusieurs principes actifs. Les excipients des pommades peuvent être simples ou composés, hydrophobes ou hydrophiles. Ils sont d'origine naturelles, synthétiques, ou semi synthétiques. Ainsi les excipients facilitent l'administration et la pénétration des principes actifs, améliorent l'efficacité du principe actif, assurent la stabilité et la bonne conservation d'un médicament. Généralement, les excipients sont classés selon leur constitution chimique ou selon leur forme physique (liquide, solide ou pâteuse) (Le Hir *et al*, 2009). Les excipients utilisés en pharmacie sont extrêmement nombreux (Tableau 4).

Tableau 4: Exemples des excipients pour la préparation de pommades (Le Hir *et al*, 2009)

Excipient		Exemples	
Excipients anhydres	Glycérides	Glycérides naturels)	Huiles végétales naturelles (Huile d'olive vierge, huile d'amande douce, huile d'arachide) Beurre de cacao
		Glycérides polyoxyéthylènes	Glycérides oléiques « P.O.E » et linoléiques. Les huiles hydrogénées
		Les cires	La cire d'abeille blanche Cire de cachalot
		Linoléine ou lanoline	La graisse de laine
	Hydrocarbures et silicones	Vaseline et paraffine (liquide, solide) Silicones (les huiles, les graisses, les résines et caoutchoucs) Silicones fluides.	
Polyoxyéthylénés-glycols (PEG) (Macrogols)			
Excipients émulsionnés (les surfactifs) Tensioactifs	Surfactifs lipophile (Emulsionnants H/L)	Stéarate de potassium, de sodium, de calcium, de triéthanolamine	
	Surfactifs hydrophile (Emulsionnants L/H)	Sels d'ammoniums quaternaires	
Excipients hydrates ou hydrogels	Surfactifs amphotères	Bétaïnes	
	Gels de produits minéraux	Gels de silices colloïdales Oxyde de titane Bentonite	
	Gels de polymères organiques	Empois d'amidon de blé Gel de Methylcelulose	
	Excipients liquides	Propylène glycol(glycérol)	

- Conservateurs

Plusieurs additifs entrent dans la composition des pommades afin de conserver le(s) principe(s) actif(s) et l' (s) excipient(s). Les conservateurs antioxydants augmentent la durée de vie des médicaments, en retardant l'oxydation des principes actifs et des excipients (Tableau 5). L'efficacité d'un antioxydant varie avec son mécanisme d'action, la nature des autres constituants du médicament, sa concentration et le moment de son addition en cours de fabrication. Par ailleurs, les conservateurs antimicrobiens sont utilisés pour réduire la prolifération microbienne, ils sont ajoutés dans le cas des préparations pharmaceutiques qui n'ont pas des propriétés antimicrobiennes suffisantes pour se protéger de la prolifération de micro-organismes, qui, dans des conditions normales de conservation et d'emploi, pourraient conduire à un danger pour le patient ou à un risque d'altération de la préparation (Le Hir *et al*, 2009).

Tableau 5 : Exemples de Conservateurs antimicrobiens et antioxydants utilisés pour les préparations galéniques à usage externe (Toé ,2004)

Conservateurs antimicrobiens	Antioxydants		
		Hydrophiles	Lipophiles
Acide sorbique	Naturel		
Acide benzoïque		Acide ascorbique	Tocophérols
Alcool benzylique	Synthétique	Métabi sulfite ou Bisulfite de sodium	Butylhydroxy-toluène
Phénol, Thiomersal			
Alcool phényléthylique		Propyl gallate	Butylhydroxy-anisol
Chlorbutol, Parabens		Agents complexants : EDTA et ses sels	Gallate d'octyle ou de dodécyle

3.2.3.4.3. Contrôle de qualité de pommades

Comme tout produit pharmaceutique, les pommades doivent remplir un certain nombre de critères d'acceptation avant leur utilisation. Plusieurs tests ont été réalisés pour contrôler la qualité de la pommade. Ces essais nous a permis de suivre l'évolution des caractères organoleptiques, physicochimiques et microbiologiques de la pommade. Les principaux tests sont les suivants (Dally *et al.*, 2007 ; Dembélé., 2011 ; Bene *et al.*, 2017).

- Contrôle macroscopique et organoléptiques tel que la consistance, la couleur et l'odeur.
- Essai d'homogénéité
- détermination du pH
- Test de la stabilité
- Test de la tolérance cutanée.
- Contrôle microbiologique (recherche des germes aérobies mésophiles, les levures et les moisissures et les germes spécifiques (*E.coli*, *Staphylococcus aureus*) (Pharmacopée Européenne,2016)

3.3. Exemples de quelques plantes médicinales thérapeutiques

De nombreuses études ont été réalisées afin de valider les effets thérapeutiques de plusieurs plantes médicinales. Les résultats obtenues montrent que les formes galéniques de ces plantes médicinales, quelque soit leurs présentations et leurs administrations, ont des effets thérapeutiques remarquables sur plusieurs maladies antalgiques, inflammatoires, dermiques.

Tableau 6: Exemples de formes galéniques de plantes médicinales et leurs effets thérapeutiques.

Plante médicinale	Type de forme galénique	Traitement thérapeutique	Référence
<i>Tamarindus indica</i> Linn	Sirop	Constipation	Mamadou,2009
<i>Securidaca longe pedunculata</i> Fresen (Polygalaceae)	pommade	Antalgique Anti-Inflammatoire	<i>Dembélé,2011</i>
<i>Khaya senegalensis a. Juss</i>	Crème, gel	antiinflammatoire	Lompo, 1999
<i>Arctostaphylos betulina</i>	Tisane	Infection urinaire	Charrié <i>et al</i> , 2017
<i>Aloe vera</i>	Crème	Psoriasis	Dhanabal <i>et al.</i> ,2012
<i>Curcuma longa</i> (Curcuma)	gel	Psoriasis.	Bonesi <i>et al</i> ,2016
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Huile essentielle	Mycoses	Mahboubi ,2015
<i>Symphytum officinale</i>	Crème	Arthrose du genou	Smith et Jacobson ,2011
<i>Adansonia digitata</i> L	Comprimés	Diarrhée	Coulibaly, 2009

Etude expérimentale

*« Une expérience scientifique est une expérience
qui contredit l'expérience commune »*

(Claude Bernard)

Matériels et méthodes

1. Objectifs

Cette étude est portée sur la valorisation de substances bioactives notamment les flavonoïdes et tanins de la plante *Aristolochia longa* et d'évaluer leurs potentiel thérapeutique dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde chez un modèle animal le rat Wistar.

A cet effet, plusieurs étapes ont été suivies :

- Extraire les flavonoïdes et les tanins de feuilles et racines d'*Aristolochia longa*
- Déterminer la teneur en flavonoïdes et tanins de deux parties
- Evaluation de l'activité antioxydante *in vitro* de deux substances bioactives citées précédemment.
- Evaluation de la toxicité aigue d'*Aristolochia longa*
- Préparation de deux formulations galéniques à base de flavonoïdes et tanins
- Analyser et contrôler la qualité de formulations galéniques préparées sur le plan physicochimique et microbiologique en utilisant différentes méthodes d'analyses
- Tester l'effet thérapeutique de formulation galénique *in vivo* sur un modèle expérimental d'arthrite rhumatoïde induit par adjuvant complet de Freund sur des Rats Wistar.

Le travail a été réalisé au niveau de laboratoire de recherche BGMSS de l'Université de Mascara et au niveau de la ferme expérimentale de la faculté SNV entre l'année 2015 et 2018.

2. Matériels

2.1. Matériel végétal

La matière végétale a été récoltée en mois de Mars 2015 à Beni Chaib, Daira de Bordj Bounaama, wilaya de Tissemsilet (Figure 11). Les caractéristiques géographiques de lieu de récolte ont été déterminées par logiciel Google Earth (Tableau 7)

Tableau 7: Lieu et site de récolte de la plante

Plante	Longitude	Latitude	Altitude
<i>Aristolochia longa</i>	1°47'58" E	35°49'12" N	650m

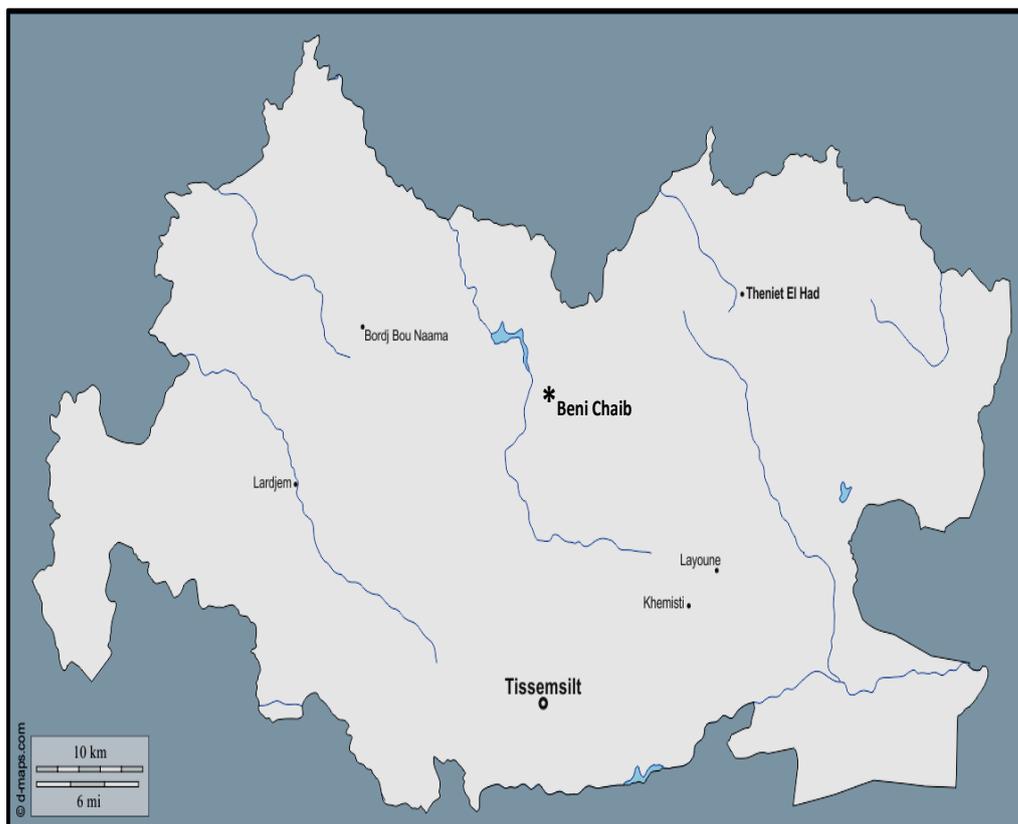


Figure 11. La carte géographique représentant le site de récolte

La plante été identifiée par les botanistes du département de biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Mascara.

Dans cette étude nous avons utilisé les feuilles et les racines d'*Aristolochia longa* (Figure 12). Les feuilles et les racines ont été séchées, moulues et réduits en poudre sèche et stockées dans un récipient hermétique pour l'extraction.

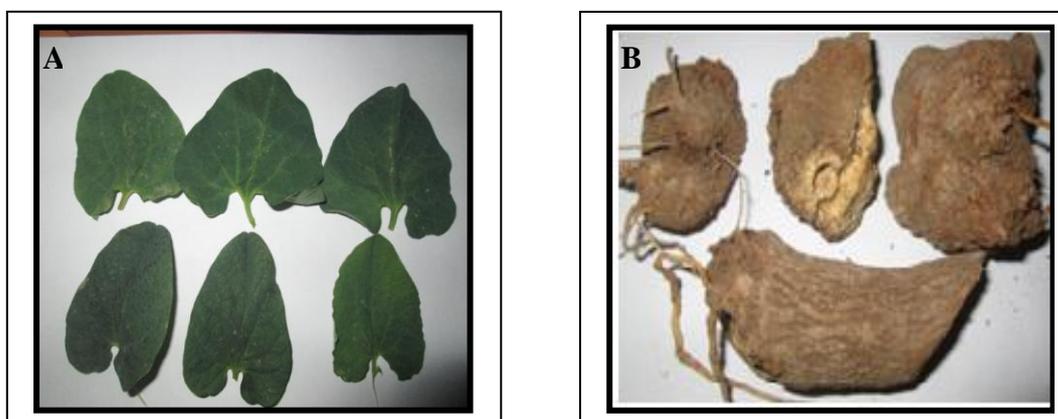


Figure 12 : Les feuilles(A) et les racines(B) d'*Aristolochia longa*

2.2. Animaux d'expérimentation

Les rats adultes « *Rattus norvegicus* » de souche Wistar males et femelles ont été utilisés dans l'étude *in vivo*. Ils ont été élevés à l'animalerie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mascara. Les conditions d'expérimentation et de traitement ont été réalisées conformément aux lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE)(1987). Pendant la période d'expérimentation, les animaux ont bénéficiés à une température ambiante de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, une humidité entre 35-60%, une alternance naturelle de jour et de nuit de $12\pm 1\text{h}$ et une nourriture avec des granules alimentaires et de l'eau par *ad libitum*.

3. Méthodes

3.1. Screening phytochimique

Les constituants phytochimiques tels que les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les stéroïdes, les saponines, les coumarines, les terpénoïdes et les anthraquinons ont été déterminés en utilisant des procédures décrites par Njoku et Obi (2009), et Sabri *et al* (2012)

- **Les Alcaloïdes**

Une quantité de 0.5g de plante en poudre est mélangé avec 5 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est ensuite filtré. Puis, 3 gouttes de réactif de Mayer est ajouté à 1ml du filtrat. L'apparition de précipité blanc ou une trouble indique la présence des alcaloïdes.

- **Les flavonoïdes**

L'extrait éthanolique (5 ml) est ajouté à 1 ml d'acide sulfurique concentré et 0,5 g de magnésium. La disparition d'une couleur rose ou bleue après 3 min de repos, indique la présence des flavonoïdes.

- **Les stéroïdes**

Un volume de 2 ml d'anhydride acétique est ajouté à un mélange de 0,5 g d'extrait éthanolique et 2 ml d'acide sulfurique. La présence de stéroïdes est révélée par une coloration bleue violette ou bleue verdâtre.

- **Les terpénoïdes**

L'extrait organique (2 ml) est dissous dans 2 ml de chloroforme. Après évaporation, 2 ml d'acide sulfurique concentré est ajouté au l'extrait sec, le mélange est chauffé pendant 2 min. Une couleur grisâtre indique la présence de terpénoïdes.

- **Les tanins**

L'extrait aqueux (2 ml) est mélangé avec 2 ml d'eau distillée. Après filtration, quelques gouttes de solution de FeCl₃ sont ajoutées. L'obtention d'un précipité vert indique la présence de tanins.

- **Les Saponines**

Un volume de 5 ml d'extrait aqueux est agité vigoureusement avec 5 ml d'eau distillée dans un tube à essai. Laisser reposer pendant 15 min. La formation de mousse stable indique la présence de saponines.

- **Les coumarines**

Une solution éthanolique (5 ml) est évaporée. Le résidu sec est ensuite dissous dans 1-2 ml d'eau distillée. La préparation obtenue est divisé en deux volumes. Le premier volume est retenue comme témoin. Le deuxième volume est repris dans 0,10 ml de NH₄OH à 10%. Deux taches sont mises sur papier filtre puis examinées sous la lumière UV. Une fluorescence intense indique la présence de coumarines.

3.2. Préparation des extraits

3.2.1. Extraction des flavonoïdes (Kenfous *et al*, 2013 avec modification)

Dix grammes de poudre végétale (feuilles et racines) ont été macérés dans 100 ml du méthanol pur pendant 24 heures. Après filtration et évaporation de méthanol à 60°C, le résidu sec obtenu a été traité avec 50 ml d'eau tiède dans le but d'obtenir un extrait aqueux. L'extrait aqueux a été soumis à une série d'extraction liquide-liquide dans des ampoules à décanter.

Cette opération permet la séparation d'un ou plusieurs constituants par l'utilisation de leur distribution inégale dans deux liquides non miscibles (Figure13).

L'opération consiste en l'ajout de 3×30 ml de chloroforme, ce qui élimine la chlorophylle et les lipides. Ensuite, de l'éther diéthylique a été ajouté pour extraire les aglycones et les flavonoïdes libres, puis l'acétate d'éthyle qui permet d'éliminer les monoosides et la majorité des glycosides de flavones. Après chaque phase, la phase aqueuse est récupérée. Au cours de la dernière phase aqueuse, le n-butanol a été ajoutée pour obtenir la phase alcoolique. Toutes les fractions obtenues ont été évaporées et séchées (figure13).

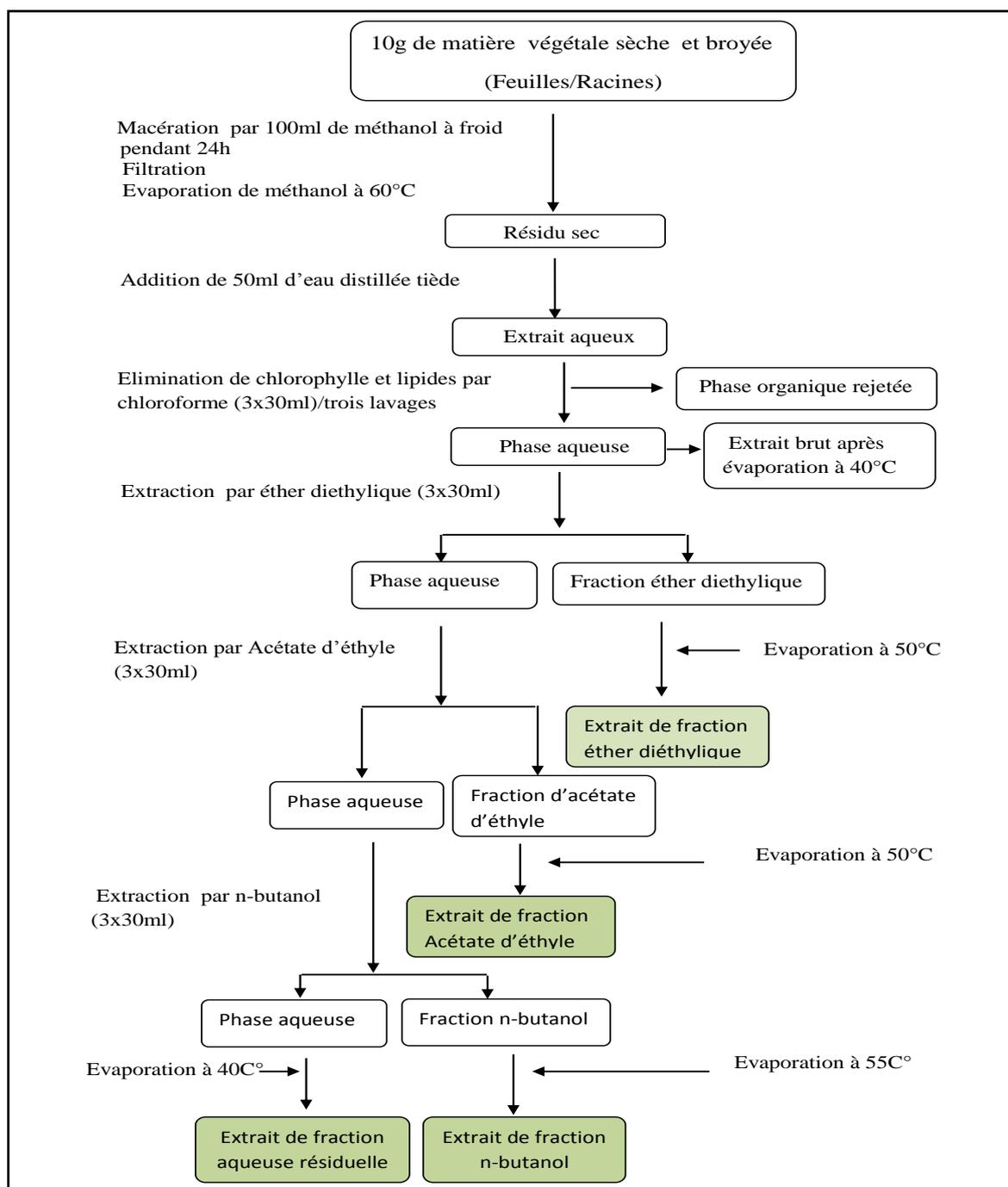


Figure 13 : Protocole expérimental d'extraction des flavonoïdes

3.2.2. Extraction des tanins

L'extraction des tanins est réalisée selon le protocole de Masunda *et al.*, 2014 avec modification .50g de poudre (feuilles et racines) est macérée dans 400ml du mélange Eau-Acétone (30/70 : V/V) pendant 24h sous agitation magnétique en trois macération . Avant chaque macération, on ajoute 4ml d'une solution de métabisulfite de sodium (0.2%) pour éviter l'oxydation des tanins .Le macérât est ensuite filtré avec du papier Watman. L'extrait acétonique aqueux (le filtrat) obtenu est concentré sous vide à 50°C jusqu'à l'évaporation complète de l'acétone (Figure 14).

L'extrait aqueux obtenu après l'élimination du solvant est épuisé dans une ampoule à décanter par éther de pétrole. Une décantation de 24h est nécessaire jusqu'à élimination totale de la fraction chlorophyllienne et lipidique. La phase aqueuse récupérée est alors soumise à différents affrontements par des solvants non miscibles à l'eau. Cette étape permet de séparer les tanins selon leur structure et leur degré de polymérisation (Lagha, 2007).(Figure 14).

L'extraction avec l'éther diéthylique (E-D) donne la fraction des tanins monomériques, celle avec l'acétate d'éthyle (A-D) donne la fraction des tanins dimériques et celle avec le butanol (n-B) donne la fraction des tanins tri et polymériques. Toutes les fractions obtenues ont été évaporées et séchées.(Figure14)

Les phases aqueuses obtenues après lavages successifs par le chloroforme et l'éther de pétrole de différents extraits aqueux, ont été récupérées et évaporées à 40°C jusqu'à l'obtention des extraits secs (extraits bruts).Ces extraits ont été préparés pour déterminer le rendement d'extraction, la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux et tanins contenus dans les feuilles et les racines d'*A.longa*. (Lagha, 2007)

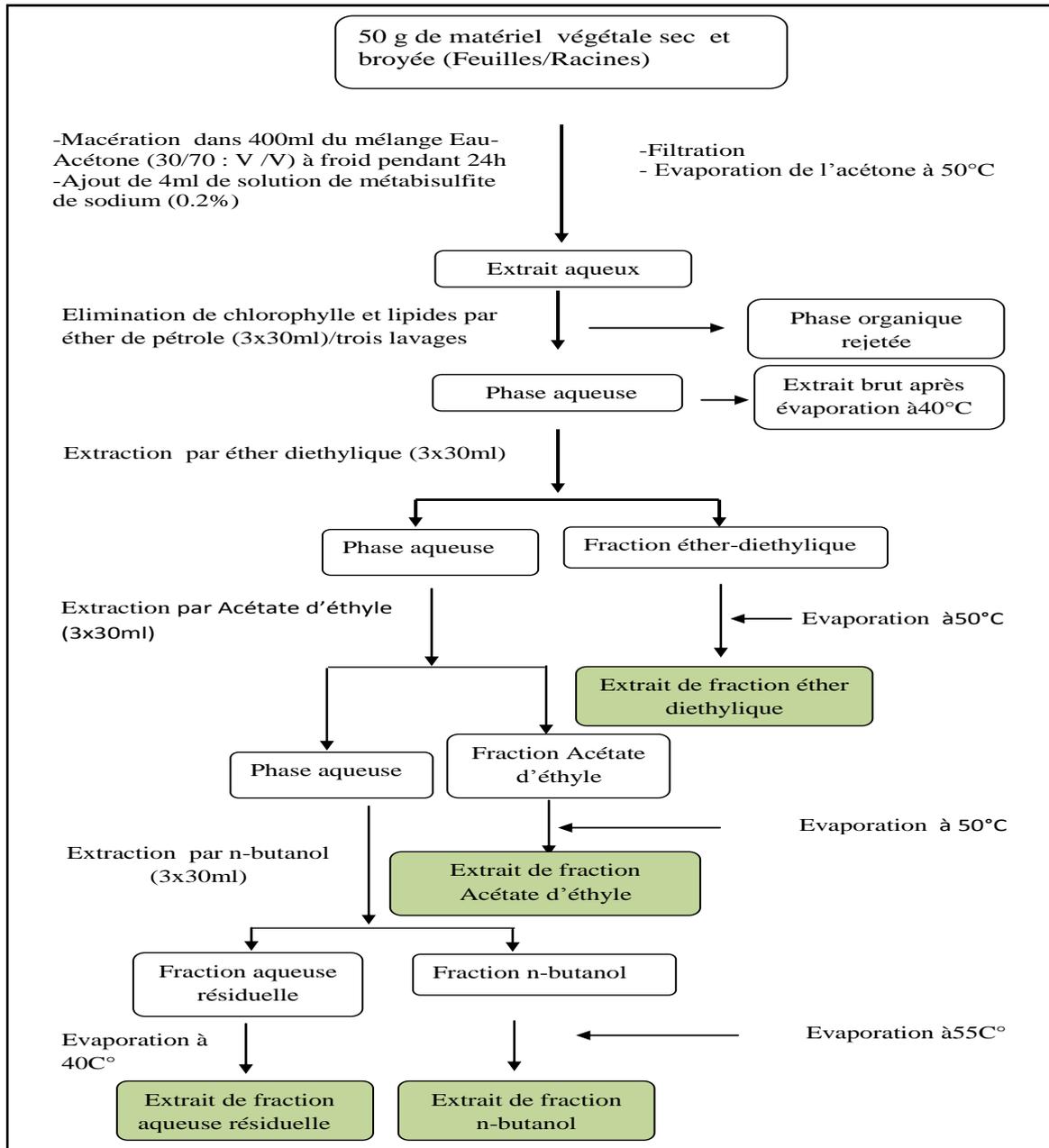


Figure 14 : Protocole expérimentale d'extraction des tannins

3.3. Calcul des Rendements d'extraction

Le rendement de différents extraits obtenus a été calculé selon la formule :

$$R\% = \frac{PE}{PMV} \times 100$$

R : rendement en %

PB : Poids de l'extrait obtenu

PMV : Poids de matière végétale

3.4. Analyse colorimétrique et spectrophotométrique des extraits

3.4.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

La teneur en phénols totaux des extraits bruts a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton *et* Rossi, 1965; Bougandoura et Bendimerad, 2013)

Une quantité de 200µl de l'extrait est mélangée avec 1ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué) et 0.8ml de carbonate de Sodium à 7.5% (Na_2CO_3). L'ensemble est incubé à température ambiante pendant 30 minutes et la lecture est effectuée contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalent d'acide gallique par g de matière végétale sèche (Figure 15).

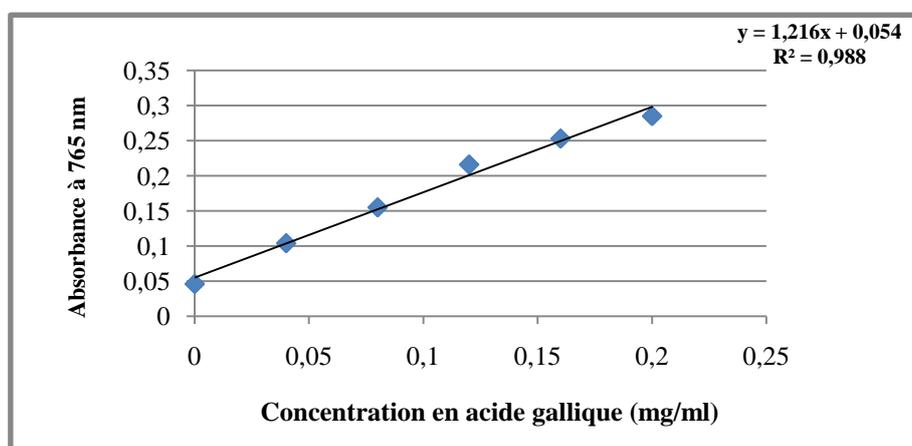


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

3.4.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits bruts et les extraits des fractions a été réalisée par le dosage spectrophotométrique selon la méthode décrite par Kim *et al.*(2003)

Dans un tube à essai, 500 µl de solution méthanolique de l'extrait est mélangé à 1500ml d'eau distillée et 150 µl de solution de NaNO_2 à 5%. A $t=5\text{min}$, une quantité de 150µl d'une solution de AlCl_3 à 10% (dissout dans l'eau distillée) est additionnée au mélange, homogénéisé et incubé pendant 6 min. A ce temps, 500 µl NaOH est ajouté. Le blanc est préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait par l'eau distillée. Les densités optiques sont lues au spectrophotomètre UV-visible (mini -1240-vis -SHIMADZU) à 510nm contre le blanc.

Une courbe d'étalonnage de la catéchine est réalisée dans les mêmes conditions que les échantillons. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg d'équivalent de catéchines par g d'extrait sec.

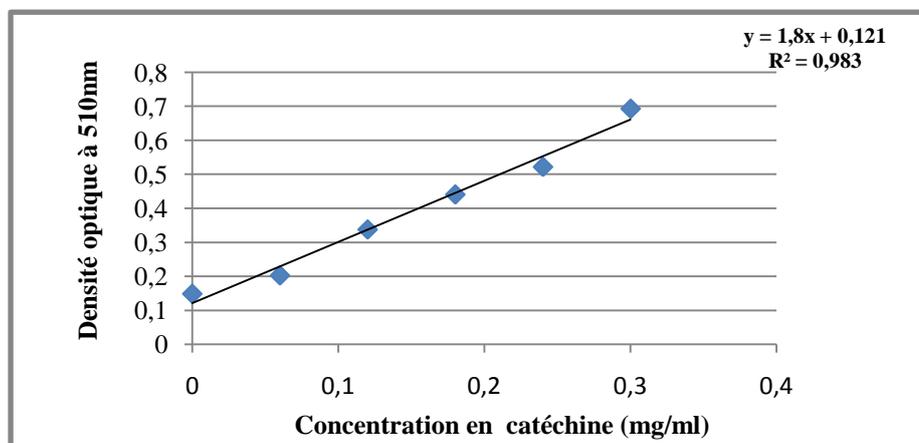


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de catéchine

3.4.3 Détermination de la teneur en tannins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide décrite par Ba et *al.* (2010). Le réactif de vanilline est préparé en mélangeant un volume égal d' HCL (8% : v/v), le méthanol (37% : v/v), et 4% de vanilline dans du méthanol (m/v). 200 μ l de chaque extrait sont ajoutés à 1000 μ l de réactif de vanilline ; le mélange est agité puis incubé à l'obscurité à 30°C pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 500nm par un spectrophotomètre UV contre un blanc constitué d'un mélange de méthanol et de HCL. Les résultats sont exprimés en mg équivalent Que/g matière végétale sèche.

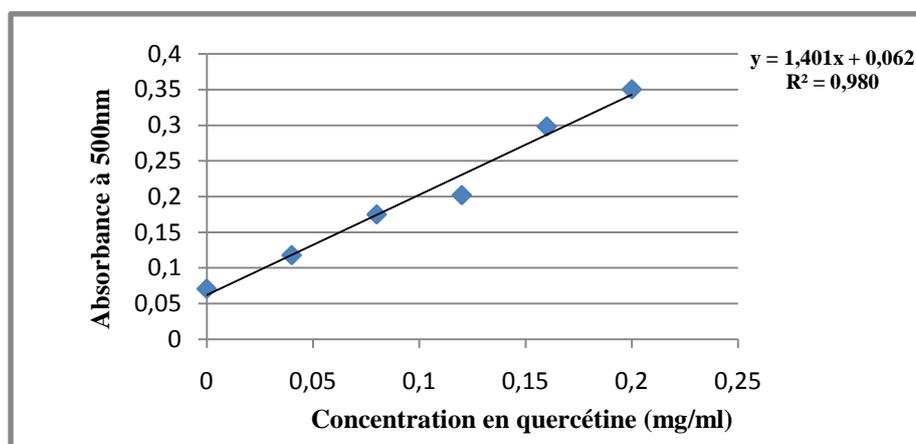


Figure 17: Courbe d'étalonnage de quercétine

3.5. Evaluation de l'activité antioxydante

Un antioxydant est défini comme étant une substance chimique capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation du substrat oxydant en faible concentration et réduire les risques des maladies oxydatives chroniques (Magalhães *et al*, 2008). Deux méthodes ont été appliquées :

3.5.1. Piégeage du radical libre DPPH

La méthode de Sanchez-Moreno *et al.* (1998) a été utilisée. Une quantité de 50µl de chaque solution méthanolique des extraits à différentes concentrations (de 0.0125 à 5mg/ml) est ajoutée à 1,95 ml de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/l). Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 50µl de méthanol avec 1,95 ml de la solution méthanolique de DPPH. Le contrôle positif est présenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons pour chaque concentration. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 515nm après 30min à l'obscurité et la température ambiante (Figure 18). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) selon la formule suivante :

$$I\% = \left[\frac{\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{test}}}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \right] \times 100$$

Les valeurs de l'IC50 ont été déterminées graphiquement par une régression linéaire.

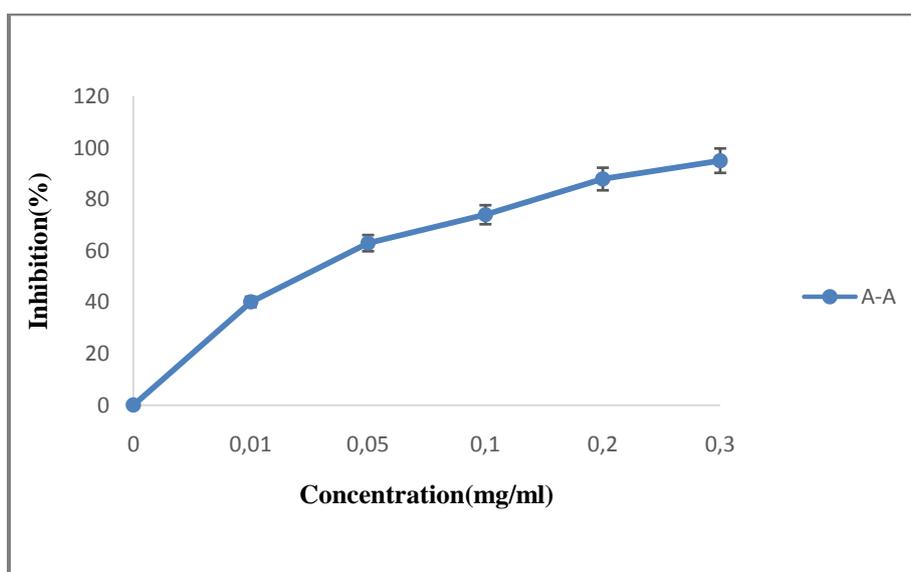


Figure 18: Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique

3.5.2. Pouvoir réducteur du fer FRAP

Le pouvoir réducteur de Fer (Fe^{+3}) dans l'extrait est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu(1986) avec modification. 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% sont additionnés à 500 μl de l'extrait à différentes concentrations (de 0.007 à 2.5mg/ml). L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20min ensuite 2,5ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10min. Un volume de 2.5ml de surnageant est combinée avec 2,5ml d'eau distillée et 500 μl de FeCl_3 à 0.1%. La lecture de l'absorbance est mesurée à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.(Figure 19).

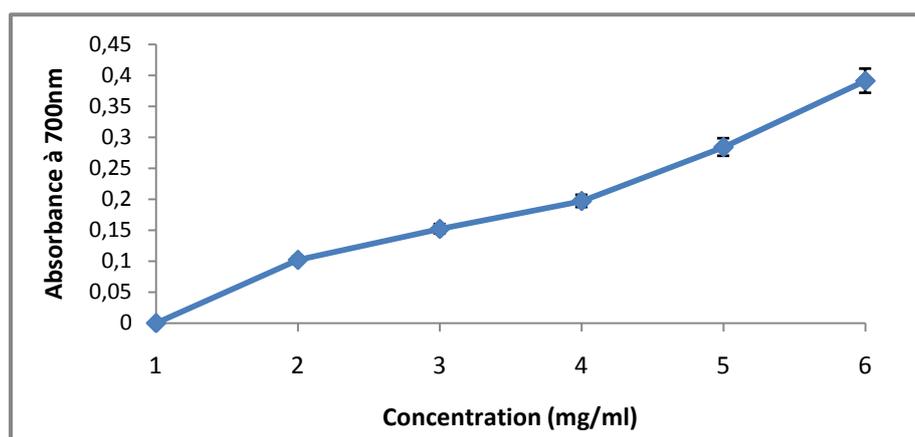


Figure 19 : Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique

3.6. Identification chimique des fractions

L'identification de fractions a été réalisée au laboratoire de bio-végétale de l'Université « Ebdelhamid Ibne Badice -Mostaganem-

D'une façon générale, la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (MS) nous permet de séparer et d'identifier qualitativement des constituants d'un mélange liquide. De plus, cette méthode est utilisée pour confirmer la présence des flavonoïdes et tanins dans les extraits d'*A.longa*. Le choix des extraits est basé essentiellement sur les résultats obtenus après l'étude quantitative et l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits.

Le profil des polyphénols des feuilles et des racines d'*A. longa* a été réalisé par un système Shimadzu (Prominence i LC-2030C 3D) équipé d'un détecteur DAD (Surveyor UV-Vis Array) et d'un spectromètre de masse LCQ Advantage (tous de Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), couplés par une source d'ionisation électrospray (ESI). La séparation a été effectuée sur une colonne Ascentis Express C18 (15 cm x 4,6 mm), garnie de particules partiellement poreuses de 2,7 µm (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

La phase mobile binaire est constituée d'eau / acide acétique: 0,075% (solvant A) et méthanol / acide acétique: 0,075% (solvant B). Le gradient était de 0-5 min: 2% de B, 5- 80 min: 2%-100% de B, 80-85 min: 100%. Le débit était de 0,8 ml / min et le volume d'injection était de 5µl. Les chromatogrammes ont été enregistrés à 280 nm.

3.7. Etude de la toxicité aiguë des extraits de fractions par voie cutanée chez les rats Wistar

L'évaluation de la toxicité d'une plante médicinale est nécessaire afin de connaître la dose qui peut présenter un effet toxique lors de son utilisation dans la phytothérapie. Cette évaluation nécessite la connaissance à la fois le type de toxicité et la dose à laquelle l'effet toxique d'une plante médicinale peut être mortel.

Dans cette étude, nous nous sommes limités au test de toxicité par administration unique (toxicité aiguë) par voie cutanée chez les rats.

Ainsi, selon les résultats obtenus dans l'étude phytochimique nous avons choisi deux extraits de fractions le premier c'est la fraction n-butanol flavonoïdique des feuilles et le deuxième c'est la fraction n-butanol tannique des racines de la plante *A longa*.

L'évaluation de la toxicité aiguë cutanée a été réalisée selon les Directives du Journal Officiel des Communautés Européennes code 402(OCDE,1987), qui consiste à répartir les rats en 5 lots de 10 rats (5 mâles et 5 femelles) de poids de (200-300g ± 5g).les rats sont mis individuellement dans des cages adaptés, Ils ont reçu deux doses 2000mg/kg et 5000mg/kg de poids corporel de deux extraits mentionnés Précédemment et du NaCl 9%(groupe témoin) par voie cutanée .Après l'application des extraits, les rats sont observés fréquemment au cours des premiers 24 heures.

Les observations cliniques relatives aux changements de comportement (tremblements, convulsions, respiration, activité) et l'évolution de poids corporel des rats sont déterminés tout au long de la période de la toxicité (14 jours).

Avant 24 heures de l'essai, une surface de 10% de la surface totale du corps de la région dorsale du fronc des rats a été tondu. La substance est maintenu en contact avec la peau par un pansement de gaz poreux et un sparadrap non irritant.

En cas de mortalité, le nombre des rats morts est enregistré a fin de déterminer la dose létale DL50.

3.8. Préparation et contrôle de la formulation galénique à base des extraits d'*Aristolochia longa*

3.8. 1. Préparation de la formulation galénique

Les médicaments administrés par voie cutanée posent moins de problèmes que ceux des autres voies, c'est pour cette raison que nous avons choisis une formulation plus classique représentée par la pommade. Nous avons préparé deux pommades avec deux extraits de fractions, la première est à base des flavonoïdes extraits à partir de feuilles et la deuxième à base de tanins extraites à partir de racines (Tableau 8).

La vaseline blanche a été utilisée comme un excipient .Elle a été achetée de la pharmacie populaire du MASCARA

Pour la formulation nous avons préparé deux pommades à 5% avec chaque type d'extrait de fraction. Le choix du pourcentage de formulations a été basé sur les résultats de la toxicité cutanée

Les pommades ont été présentées par les symboles suivants :

F1 : formulation à base de flavonoïdes

F2 : formulation à base de tanins

Tableau 8: Composition de la formulation galénique (Biyiti *et al.*, 2012)

Composant (g)	Rôle	Préparation de 100g de pommade à 5%	
		Formulation (F1)	Formulation (F2)
Extrait	Principe actif	5	5
Benzoate de Sodium	Excipient(Conservateur)	0.01	0.01
Huile de vaseline	Excipient	0.1	0.1
Tween 80	Excipient	3	3
Vaseline blanche	Excipient	91.87	91.87

Mode de préparation

- Dans un cristalliseur faire liquéfier la quantité de vaseline sur la plaque chauffante et incorporer successivement le benzoate de Sodium jusqu'à la solubilisation, puis l'extrait et on laisse refroidir le mélange.
- Mettre le mélange initial dans un mortier, une fois qu'il commence à refroidir, ajouter l'huile de vaseline et le tween 80.
- Mélanger le tout à l'aide du pilon jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
- Mettre chaque pommade à base des flavonoïdes et tannins dans un récipient hermétique et conserver ces dernières dans un endroit frais.

Il faut noter que les extraits ont été d'abord dissous dans quelques gouttes d'eau distillée afin de faciliter leur dissolution.

3.8. 2. Contrôle de la qualité de la formulation galénique

3.8. 2. 1. Observation macroscopique et organoleptique

L'examen des caractéristiques macroscopiques constitue la première approche de la qualité de la préparation, afin de lui permettre l'observation de toute anomalie. En effet, des modifications perçues au niveau des caractéristiques visuelles, olfactives, sont des indicateurs possibles d'une dégradation de causes diverses (oxydations, variation de pH) (Mebarki ,2010).La consistance, l'homogénéité, l'odeur et la couleur de la pommade ont été déterminés (Sanogo *et al*, 2006 ; Dally *et al*, 2007).

3.8. 2. 2. Mesure du pH

La mesure du pH est importante car, il influe sur la stabilité, la tolérance cutanée des préparations et l'incompatibilité entre les différents constituants (Toé, 2004).

Elle doit être déterminée à l'aide d'un pH mètre, soit directement sur la préparation, soit sur une dilution ou une dispersion, le plus souvent au dixième dans de l'eau distillée bouillie. Toutes fois des électrodes, de forme adaptée, peuvent rendre cette dilution inutile. La mesure du pH peut se faire aussi avec des réactifs colorés. (Seiller et Martini, 1996).

Le pH des formulations a été déterminé directement sur une quantité de 10g de pommade par l'utilisation d'un pH mètre de la marque HANNA (pH 210). Le pH mesuré doit être proche de celui de la peau (4,2-5,8) (Eyang Esseng, 2007).

3.8. 2. 3. Homogénéité

Le test d'homogénéité a pour but de mettre en évidence la bonne répartition des composants en poudres (extrait et les excipients) et de vérifier visuellement l'absence d'agrégats.

L'homogénéité de la pommade a été appréciée en se basant sur l'uniformité de la coloration par la technique de la centrifugation qui utilise 10 ml de la formulation à centrifuger pendant 15 min à 1500 tr/min et par l'étalement d'une quantité de pommade en couche mince sur une surface plane à l'aide d'une spatule (Dally *et al.*2007).

2.8. 2. 4. Contrôle microbiologique de la formulation galénique

Cette étape est fondamentale, elle consiste à la recherche et le dénombrement des germes pathogènes bactériens et fongique possiblement présents dans les formulations. Le contrôle microbiologique a pour but d'éviter toute altération après leur utilisation.

En effet, la présence de certains microorganismes dans des préparations non stériles peut réduire l'effet thérapeutique du produit. Les différentes étapes du contrôle de la qualité microbiologique sont résumées dans la figure 20.

- **Microorganismes recherchés**

La détermination de critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutique non stériles est basée sur les résultats du dénombrement des germes aérobies totaux (DGAT) , des moisissures et des levures totales(DMLT) ainsi que la recherche de certains germes spécifiés selon la voie d'administration (Pharmacopée. Européenne, 2016). (Tableau 9).

D'une règle générale, la Pharmacopée Européenne décrit plusieurs techniques de référence pour le dénombrement de germes (2014) : la filtration sur membrane, le dénombrement sur plaque et la méthode du nombre le plus probable.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au dénombrement sur plaque soit par ensemencement en profondeur, soit par étalement en surface. Tous les tests sont réalisés dans des conditions permettant d'éviter toute contamination microbienne extrinsèque du produit à examiner.

Tableau 9 : Critères d'acceptation de la qualité microbiologique des formes pharmaceutiques non stériles (Pharmacopée. Européenne, 2016).

Voie d'administration	DGAT (UFC/g ou UFC/ml)	DMLT (UFC/g ou UFC /ml)	Microorganismes spécifiés
Buccale Gingivale Cutanée Nasale Auriculaire	10^3	10^2	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml) Abs de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g ou 1ml)
Transdermique (limites pour un dispositif transdermique, film protecteur et support compris)	10^3	10^1	Abs de <i>Staphylococcus aureus</i> (1g ou 1ml) Abs de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g ou 1ml)

- **Préparation des échantillons**

Une quantité de 10g de chaque formulation galénique obtenu aseptiquement a été mélangée à 90 ml du tampon peptoné au chlorure de sodium pH 7 (TSE) (Annexe 3). Le mélange obtenu a été homogénéisé en agitant au vortex pendant 30 secondes. Le mélange (solution A) a été utilisé pour le dénombrement des germes aérobies mésophiles viables totaux, dénombrement de moisissures et levures ainsi que la recherche de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. (Pharmacopée. Européenne, 2014)

- **Dénombrement des germes aérobies mésophiles, les levures et les moisissures**

1 ml de la solution A de chaque dilution été prélevée puis versée aseptiquement dans les boites de pétri, puis complété a raison de 20ml à 25ml de la gélose TSA(annexe) pour les bactéries et Sabouraud (SG) 4% (annexe) pour les levures et moisissures. Les boites TSA sont incubées à 30-35 °C pendant 3 à 5 jours et les boites SGG (annexe) à 20-25 °C pendant 5 à 7 jours (Pharmacopée Européenne, 2014) (Figure20).

- **Recherche des germes spécifiques** (Pharmacopée. Européenne, 2014)

- **Recherche des *Staphylococcus aureus***

10 ml de l'échantillon (équivalent de 1g de pommade) a étéensemencé dans 100ml du milieu Bouillon Tryptone Soja (TSB), et incubées à 33°C pendant 24h, puis 0.1 ml de volume a été repiqué sur le milieu gélosé sélectif « Chapman ». L'incubation a été faite à 33°C pendant 72h. La croissance de colonies jaunes/blanches entourées d'une zone jaune indique la présence de *S. aureus*, à confirmer par des essais d'identification (Figure20)

➤ **Recherches de *Pseudomonas aeruginosa***

10 ml de l'échantillon ont été additionnées avec 100 ml du milieu TSB, et incubées à 33°C pendant 24h, puis 0.1 ml de volume a été ensemencé sur le milieu gélosé sélectif « Cétrimide ». L'incubation a été faite à 33°C pendant 72h. La croissance des colonies verdâtre et fluorescente indique la présence de *Pseudomonas aeruginosa*. La présence de ce germe est confirmé par des tests d'identification (Figure20)

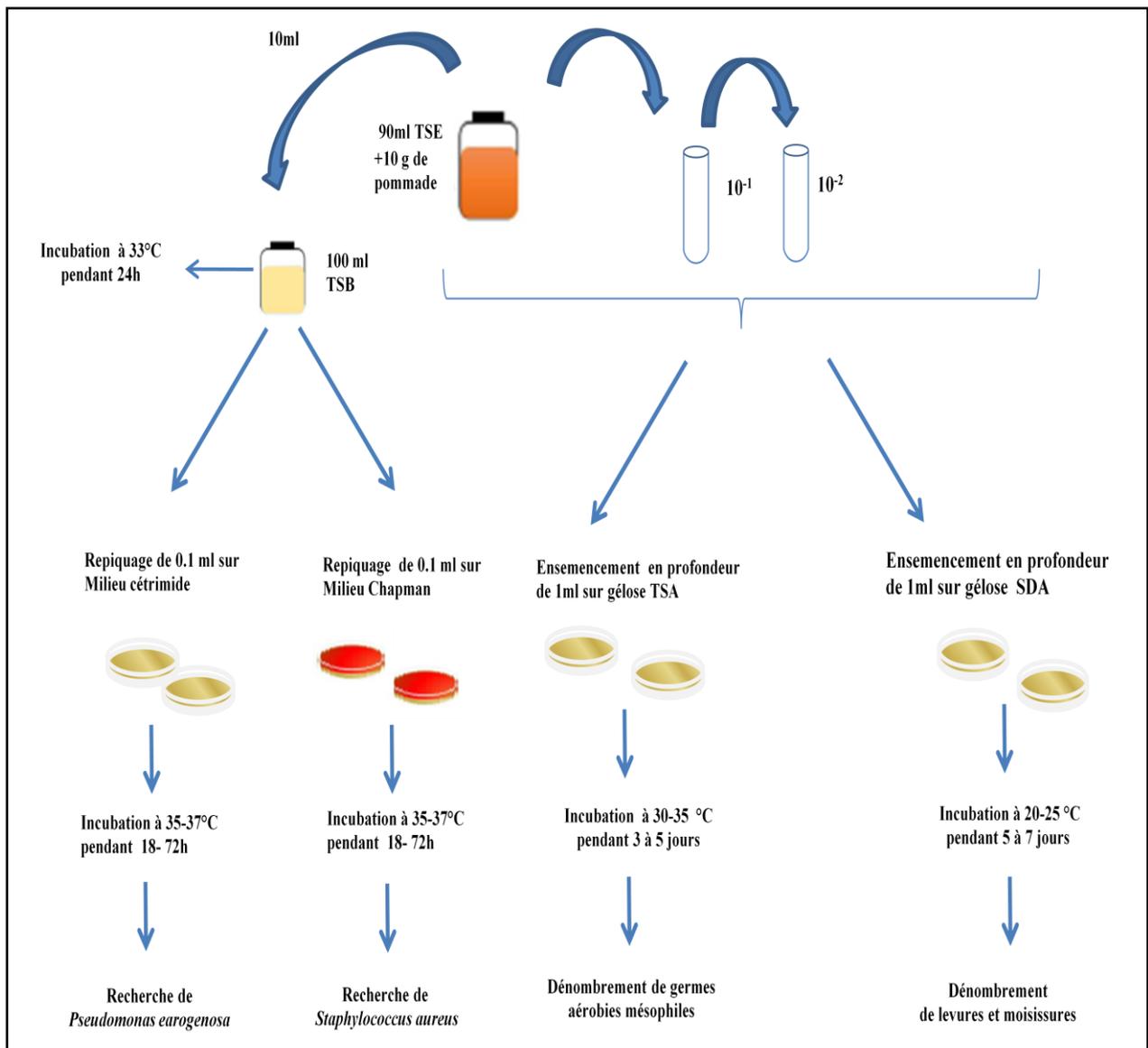


Figure 20 : Schéma récapitulatif de contrôle microbologique de la forme galénique (pommade)

3.8. 2. 5. Contrôle de la stabilité

L'étude de la stabilité constitue un élément clé lors du développement et de la commercialisation de nouveaux produits et substances actives. Ce test garanti que le produit répond aux spécifications, dans les conditions de stockage définies et pendant toute sa durée de vie (Boukhira, 2017).

Dans ce test, nous avons évalué quelques critères microbiologiques, physicochimiques (pH) et organoleptiques (homogénéité, couleur et consistance) en fonction de différentes températures de conservation choisies ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) pendant 28 jours de conservation. (Marchand *et al.*, 2011 ; Boukhira *et al.*,2017)

2.8. 2. 6. Test d'irritation primaire cutanée (Test de tolérance cutanée)

Le contrôle toxicologique sert à déterminer la toxicité des produits chimiques que nous utilisons. Ce contrôle nous donne des informations sur les produits chimiques industriels, pharmaceutiques et naturels. Toutefois, il est nécessaire de vérifier la tolérance locale cutanée et le degré d'irritation cutanée de nos formulations galénique avant d'évaluer leur effet thérapeutique.

- **Principe**

L'évaluation de l'indice d'irritation cutanée été déterminé selon la méthode officielle décrite par l'article N°1, publié au Journal officiel de la République française (JORF) du 21 février 1982. Ce test est utilisé pour la détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée d'une pommade préparé à base de plante médicinale. La méthode est basée sur l'observation des réactions cutanées provoquées après l'application unique de la formulation galénique.

- **Protocole d'expérimentation**

- La méthode est réalisée sur 06 rats Wistar male du poids corporel compris entre 300-350 g.
- Des rats sélectionnés ont été élevés dans des cages au niveau de la ferme expérimentation selon les conditions citées en paragraphe (2.2 Page 43)
- Avant l'application de la formulation, tondre le dos et les flancs de rats pour dégager une surface d'environ 5cm X 5 cm.

-La droite de l'axe vertébral, à l'aide d'un vaccinostyle et avec précaution, trois scarifications parallèles sur une longueur d'environ 2,5 cm, espacées de 0,5 cm environ sont effectuées. Les scarifications de l'épiderme sont réalisées sans atteindre le derme (sans saignement).

- 0.5 g de la formulation est appliquée sur la peau (zones scarifiées et non scarifiées), soit directement, soit après l'avoir déposé sur les pièces de gaze, de manière à éviter toute perte,

-La pommade est maintenue en contact avec la peau et la pièce de gaze sur chacune des deux zones avec la bande de fixation

-La compresse de protection est placée et l'ensemble est maintenu par un pansement (Sparadrap) .Enfin Le pansement et les pièces de gaze sont enlevées 24 heures après l'application de la pommade.

- **Evaluation de l'indice d'irritation primaire cutanée**

L'irritation primaire cutanée a été évaluée trente minutes environ après l'enlèvement du pansement et à 72heurs après l'application de la pommade. Les observations de l'érythème (formation d'escarres) et formation d'œdème sont faites sur les deux zones, scarifiées et non scarifiées, selon l'échelle numérique du Draize (1959) présenté dans le tableau 10

Tableau 10: Echelle numérique de l'érythème et l'œdème

Erythème		Œdème	
Pas d'érythème	0	Pas d'œdème	0
Leger érythème (à peine visible)	1	Très léger œdème	1
Erythème bien visible	2	Leger œdème (contours bien définis, gonflement apparent)	2
Erythème important	3	œdème moyen (épaisseur environ 1 mm)	3
Erythème grave (rouge pourpre) avec ou sans escarres (lésions profondes)	4	œdème grave (épaisseur supérieure à 1 mm et surface supérieure à celle de la zone d'application)	4

L'indice d'irritation primaire cutané est calculé par l'addition des chiffres obtenus pour l'érythème et pour l'œdème après 24 heures et 72 heures sur les six zones non scarifiées d'une part et d'autre part sur les six zones scarifiées. Les chiffres ainsi obtenus sont additionnées, après le total est divisé par 24 .La moyenne obtenue représente l'indice d'irritation cutané primaire (IP), selon la formule suivante :

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

24 : est le nombre de rats (6) multiplié par le nombre des flancs testés (scarifié et sain =2) multiplié par le nombre de type d'irritation (érythème et œdème=2)

- **Expression des résultats** (Boukhatem et *al.*,2010).

Non irritant : $IP \leq 0.5$.

Légèrement irritant : $0.5 \leq IP \leq 2$,

Irritant : $2 \leq IP \leq 5$.,

Très irritant : $5 \leq IP \leq 8$.

3.9. Evaluation de l'effet thérapeutique de la formulation galénique

Afin de déterminer l'effet thérapeutique des formulations galéniques préparées à partir de la plante *Aristolochia longa* , nous avons choisis un modèle d'inflammation chronique.

3.9.1. Choix de modèle expérimental de la polyarthrite rhumatoïde

L'utilisation de modèles animaux de l'inflammation chronique permet d'étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués, tester et évaluer des préparations thérapeutiques à base des plantes médicinales. Le modèle d'arthrite rhumatoïde chez le rat Wistar est l'un des principaux modèles les plus utilisés dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire.

Le traitement et la prévention de l'arthrite rhumatoïde dépendent en grande partie de l'accumulation des connaissances concernant les facteurs génétiques et environnementaux déclenchant la maladie, ainsi que les effecteurs immunologiques qui y participent. Pour cela, des modèles animaux ont commencé à être proposés depuis la description de la maladie humaine (Waksman, 2002).

Ce modèle de la polyarthrite était de provoquer la maladie par injection unique d'adjuvant complet de Freund (CFA) en suspension contenant un composant de la paroi cellulaire de la souche *Mycobacterium tuberculosis* inactivé, qui induira non seulement des lésions sur la patte percée mais aussi ,des lésions sur les chevilles, poignets et les petites articulations inter-phalangiennes distales (Totoson, 2015).

3.9.2. Répartition des groupes (Aiyalu *et al.* , 2016)

Les rats Wistar du poids de 150 à 200g ont été repartit en six groupes, chaque groupe compose de 06 rats :

Groupe 1 : groupe non traité (témoin)

Groupe 2 : groupe induit et non traité (groupe arthritique)

Groupe 3 : Groupe induit et traité par la vaseline (groupe placebo)

Groupe 4 : Groupe induit et traité par la formulation F1

Groupe 5 : Groupe induit et traité par la formulation F2

Groupe 6 : Groupe traité par diclofénac diéthylamine(Emulgel de 1%) (Traitement de référence)

3.9.3. Induction

Le Protocole suivi est celui décrit par Aiyalu *et al* (2016) .Sous anesthésie générale de l'animal par isoflurane, 0.1ml du CFA été injecté dans la région sub-plantaire de la patte postérieure gauche de l'animal.

3.9.4. Traitement

Après 21 jours de l'induction par CFA, et après la confirmation du développement de l'arthrite, la Vaseline, F1, F2 et diclofenac diéthylamine (Emulgel à 1%) ont été administrés par voie cutanée pendant 21 jours.

La fréquence d'application du traitement sur la cheville est fixée à une application par jour, la quantité appliquée est de 0.3 g de formulation F1et F2, la vaseline et le traitement de référence (Sharififara *et al*, 2009)

3.9.5. Evaluation de l'activité antiinflammatoire

A fin d'évaluer l'effet antiinflammatoire de nos formulations galéniques à base de flavonoïdes et tanins de la plante sur le modèle d'arthrite rhumatoïde chez les rats Wistar, les paramètres cliniques , biologiques , des examens radiologiques et coupes histopathologiques ont été suivis :

3.9.5.1. Suivi des paramètres cliniques

3.9.5.1.1. Evolution du poids corporel des rats avant et après du traitement

Le poids corporel de rats de tous les groupes a été mesuré avant l'expérimentation et au cours de la période du traitement soit le 4^{ème}, 8^{ème}, 14^{ème}, 21^{ème}, 25^{ème}, 29^{ème}, 35^{ème} et 42^{ème} jours.

3.9.5.1.2. Suivi de l'œdème

L'œdème a été évalué en fonction de l'évolution du volume de la patte du rat tout au long de l'expérimentation.

Le volume de la patte arrière gauche de tous les rats a été mesuré au jour 1 et au cours de la période de l'induction par l'adjuvant Complet de Freund (CFA) à 4^{ème}, 8^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours et après le traitement à 25^{ème}, 29^{ème}, 35^{ème} et 42^{ème} jours en utilisant le Pied à coulisse numérique.

A fin de déterminer l'effet antiarthritique, le pourcentage d'inhibition (% INH) de l'œdème de pattes traitées de chaque lot a été calculé par rapport au lot induit non traité, selon la formule suivante (Sene *et al*, 2016) :

$$\%INH = \frac{\%AUG_{\text{induit non traité}} - \%AUG_{\text{traité}}}{\%AUG_{\text{induit non traité}}} \times 100$$

Le pourcentage d'augmentation de l'œdème (%AUG) a été déterminé par la formule suivante

$$\%AUG = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

V_t : Volume de la patte au temps t

V₀ : Volume initial de la patte

3.9.5.1.3 Indice arthritique

Un indice arthritique est calculé comme la somme des scores indiqués ci-dessus pour chaque animal. La moyenne obtenue chez les animaux traités est comparée à celle des animaux du groupe témoin (Gerhard, 2002), en utilisant les critères présentés dans le tableau suivant:

Tableau 11. Les différents scores de l'indice arthritique

Site de lésion	Nature de lésion	Score
Oreilles	Absence de nodules et de rougeur	0
	Présence de nodules et de rougeur	1
Nez	Pas de gonflement du tissu conjonctif	0
	gonflement du tissu conjonctif	1
Queue	Absence de nodules	0
	Présence de nodules	1
Pattes antérieures	Absence de l'inflammation	0
	Inflammation d'au moins un membre	1
Pattes postérieures	Absence d'inflammation	0
	Inflammation légère	1
	Inflammation modérée	2
	Inflammation sévère	3

3.9.5.2. Evolution des paramètres biologiques

3.9.5.2.1. Suivi de masse relative des organes

Non seulement, la polyarthrite atteint les articulations mais, elle peut provoquer des complications qui touchent de nombreux organes. Par ailleurs les traitements suivies peuvent aussi agir sur la fonction biologique des organes c'est pour cette raison, la détermination de leurs poids est nécessaire.

A la fin du Protocole expérimental soit à 42jours, les rats ont été mis à jeun pendant 24 h, puis disséqués. Les organes prélevés étaient le foie, les reins, les poumons, le cœur, thymus et la rate. Ces derniers ont été rincés avec une solution salée à 0,9%, puis pesés.

Le poids relatif de chaque organe a été calculé suivant la formule (Lignes directrices d'OCDE, 2008) :

$$\text{Pr} = \frac{\text{Po}}{\text{Pa}} \times 100$$

Pr : poids relatif de l'organe (g/100 g) ;

Po : poids de l'organe (g) ;

Pa : poids corporel du rat (g).

3.9.5.2.2 Suivi les indices du thymus et de la rate

Le système immunitaire est organisé avec un ensemble de tissus et d'organes lymphoïdes primaires ou centraux tel que le thymus, qui est le siège de la production et la différenciation des cellules immunitaires et secondaires ou périphériques tel que la rate qui élimine les microorganismes provenant de la circulation sanguine participe à la destruction des cellules sanguines âgées ou anormales (Badiwa-Bizowe, 2007).

La rate et le thymus retirés après la sacrifice ont été rincés avec une solution salée à 0.9%, puis pesés. Les indices du thymus et de la rate ont été évalués en fonction du rapport du poids humide du thymus et de la rate (mg) sur le poids corporel des rats (g) (Zhang *et al.*, 2004).

3.9.5.2.3. Prélèvement et analyse du sang

Les prélèvements du sang ont été effectués à l'aide d'une pipette pasteur à travers le sinus rétro-orbitaire de l'œil (Aiyalu *et al.* , 2016), aux 21^{ème} jours et à partir de l'aorte abdominale aux 42^{ème} jours. Le sang a été récupéré dans des tubes contenant le anticoagulant (EDTA). Tous les tubes subirent une centrifugation à 3000 tour/min pendant 10 min.

Les sérums obtenues après la centrifugation ont été recueillis dans des tubes Eppendorf et conservés à une température de -4°C pour réaliser les analyses biochimiques suivantes :

- **Facteur rhumatoïde**

Le facteur rhumatoïde (FR) est un anticorps anti-gammaglobulinique qui appartient le plus souvent à la classe des IgM. Le facteur rhumatoïde apparaît principalement chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde. Il participe à la formation des complexes immuns et active le complément ce qui induit des lésions vasculaires (Aho *et al*, 1991)

Pour estimer l'intensité de l'inflammation retrouvée au cours de la polyarthrite rhumatoïde, une méthode de turbidimétrie au latex a été utilisée à l'aide du kit RF Latex(Annexe), où le facteur rhumatoïde provoque une agglutination des particules de latex recouvertes avec gamma-globuline de l'animal. La lecture du facteur RF obtenus de tous les groupes a été comparée à celle des rats témoins. Les valeurs ont été exprimées en UI / ml.

- **Protéine C-réactive**

La protéine C-réactive (CRP) est un marqueur de l'inflammation, présente dans le sérum normal, elle augmente considérablement après la plupart des formes de lésions tissulaires, d'infections bactériennes et virales, d'inflammation et de néoplasie maligne.

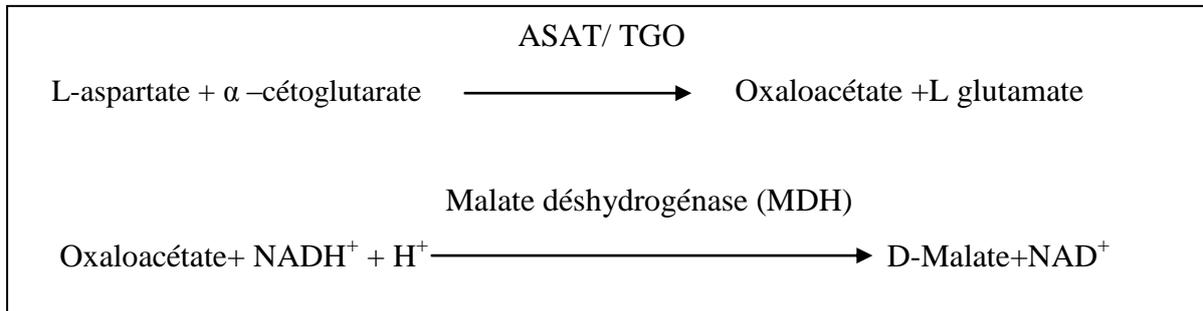
La détermination qualitative et semi quantitative de CRP dans le sérum a été réalisé par le test-CRP latex d'agglutination sur lame du kit SPINREACT (Annexe). Les particules de latex enduites d'IgG de chèvre anti-CRP humain sont agglutinées lorsqu'il est mélangé avec des échantillons contenant du CRP.

- **Dosage de transaminases hépatiques**

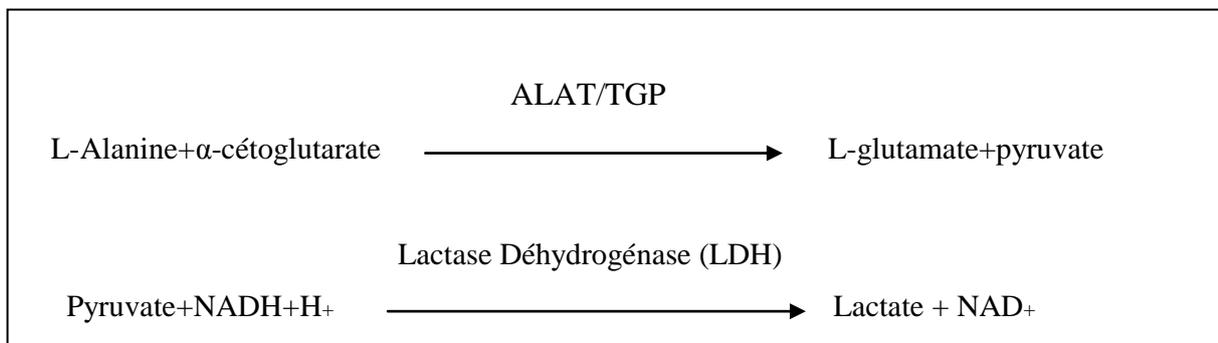
La fonctionnalité du foie peut être mesurée par les enzymes appelés transaminases (ASAT-ALAT) qui sont des enzymes importants de l'organisme dont le rôle est de transférer et catalyser en présence d'une coenzyme, un groupe amine lors de nombreux processus chimiques qui se déroulent au niveau hépatique pour produire l'acide oxaloacétique et l'acide pyruvique (Siby, 2008).En effet, une altération de la fonction hépatique résulte d'une augmentation de ces enzymes dans le sang.

Le dosage de transaminases a été faite à l'aide de Kit de SPINREACT (Annexe) selon les réactions suivantes (Kaplan *et al*. 1984)

A/ Aspartate Amino Transférase (ASAT) ou Transaminase Glutamo-oxalo-acétique (TGO)



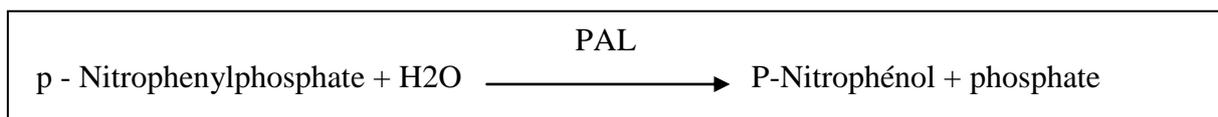
B/ Alanine Amino Transférase (ALAT) ou Transaminase glutamopyruvique (TGP)



- **Dosage de phosphatase Alcaline (PAL)**

Les phosphatases alcalines (PAL) sont des enzymes qui se trouvent dans la plupart des tissus de l'organisme, en particulier les os et le foie.

Les taux de phosphatases alcalines augmentent naturellement pendant la croissance et pendant la grossesse. Une augmentation en dehors de ces périodes peut refléter la présence d'une maladie hépatique ou osseuse. L'enzyme hydrolyse de p- nitrophenyl phosphate à pH= 10,4 selon la réaction suivante (Rosalki *et al.*, 1993)



Une élévation du taux des phosphatases alcalines se rencontre dans, les maladies osseuses, les métastases osseuses, la maladie de Paget, l'ostéomalacie, l'ostéodystrophie rénale, et l'hyperparathyroïdie.

- **Dosage du Calcium**

Le calcium est le minéral le plus commun dans le sang. Il est nécessaire au bon fonctionnement de toutes les cellules de l'organisme, il aide à construire des os et des dents solides, il est impliqué dans la fonction cardiaque, la contraction musculaire, la signalisation nerveuse ou encore la coagulation sanguine.

Le taux de calcium est déterminé par une méthode colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre par un kit de Biomaghreb (Annexe) ou le calcium forme avec le complexant crésolphatéline en milieu alcalin un composé coloré en violet dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en calcium, il est exprimé par mg/dl.

3.9.5.4. Analyse radiologique

Le diagnostic ne peut pas être fait seulement par des analyses cliniques ou par des analyses biochimiques, donc, il est nécessaire d'ajouter divers types d'exams complémentaires (radiologie, scanner, IRM etc...). Dans la pathologie osseuse comme l'arthrite rhumatoïde et l'arthrose, les exams radiologiques osseux sont importants et nécessaires pour déterminer les caractéristiques de la lésion.

L'analyse radiologique a été réalisée au niveau de l'hôpital Dali Abdelkader à Ghriss wilaya de Mascara.

Après sacrifice des rats dans 42^{ème} jours, les pattes postérieures des rats induites par CFA non traités, des rats traités par formulations F1 et F2, la vaseline et diclofinac et la patte postérieure gauche du rat témoin, ont été prélevées, séparées de la graisse superficielle et conservées directement dans le formol 10% (Aiyalu *et al*,2016). Les radiographies ont été prises à l'aide d'appareils à rayons X (AGEA2400) et une cassette (AGFACPB 400) à rayons X industriels, avec une exposition de 150mA, une durée de 0.2 sec et une intensité de 51 Kv. Les clichés ont été développés par un révélateur, un fixateur et eaux. (Carlson *et al*, 1985 ;Chitme *et al*, 2009).

Dans le cas de l'arthrite rhumatoïdes, plusieurs signes radiologiques apparentent avec une déminéralisation osseuse épiphysaire, un pincement articulaire global (par atteinte globale du cartilage), des érosions osseuses et des géodes sous-chondrales (à la jonction de la membrane synoviale et de l'os destructrice du pannus rhumatoïde), des déformations articulaires (subluxation et luxation) par atteinte Teno-synoviale et une disparition de l'interligne articulaire.

3.9.5.5. Analyse histologique

Comme l'examen radiologique est utile dans le diagnostic et l'évaluation de la polyarthrite rhumatoïde, l'étude histologique est devenue nécessaire afin de suivre les modifications pathologiques de l'articulation ainsi que le cartilage de la cheville.

Généralement les coupes histologique d'une poly arthrite rhumatoïde sont caractérisées par un infiltrat inflammatoire synovial (majoritairement neutrophile) qui devient ensuite périarticulaire et péri-tendineux avec un œdème des tissus mous essentiellement au niveau de la cheville et du poignet, un dépôt articulaire de fibrine, des foyers de nécrose accompagnée de prolifération de synoviocytes, de fibroblastes, ainsi qu'une activation des ostéoclastes et ostéoblastes (Totoson,2015).

La préparation des coupes histologiques a été réalisée au niveau de l'hôpital de MESLEM Tayeb, Mascara (Service Anapathologie) .

- **Préparation des échantillons**

Les rats testés ont été sacrifiés aux 42 ème jours .Les articulations de la cheville ont été séparées de la patte postérieure gauche, immergées dans le formol tamponné 10% pendant 24heures et préparées pour les analyses histologique selon les étapes suivantes :

- **Décalcification**

Après la fixation par le formol, les articulations ont été décalcifiées par l'acide formique à 5% (dilué dans l'eau,) (Schmitz *et al*, 2010). Pour confirmer la détermination de la décalcification, la méthode de Luna (1992) a été appliquée. 5 ml d'hydroxyle d'ammonium à 5% et 5 ml d'oxalate d'ammonium à 5% sont ajoutés à 5ml de la solution de décalcification, puis vortexés.

La formation d'un précipité blanc nuageux de calcium au cours de 15min indique que la décalcification n'est pas terminée. Le changement de la solution de décalcification est obligatoire jusqu'à l'obtention du point final de la décalcification des articulations.

- **Déshydratation, imprégnation et inclusion**

Après la décalcification du cartilage de l'articulation de la cheville, les échantillons sont rincés plusieurs fois dans le tampon phosphate salin (PBS), déshydratés en alcools à différentes concentrations (70%, 95% et 100%), clarifiés par le xylène, placés dans des cassettes, puis dans l'automate d'imprégnation.

Les pièces obtenues sont mises en blocs de paraffine à l'aide un appareil d'inclusion. Le refroidissement de ces derniers a été réalisé par une plaque froide.

- **Préparation des coupes et coloration**

Des coupes du bloc de paraffine de 5µm d'épaisseur ont été faites à l'aide un microtome (LEICA RM2235). Les coupes ont été recueillies sur des lames en verre. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les lames ont été déparaffinées par la chaleur et des bains de xylène ou toluène pendant 2min, l'hydratées en l'immergeant dans des bains d'alcool de degré décroissant (100%, 95% et 75% pendant 2 min) puis dans l'eau distillée (pendant 10 seconde).

La coloration des lames été réalisée selon les étapes suivantes :

- Colorer à l'hématoxyline pendant 5 min pour colorer les noyaux.
- Rincer à l'eau courante pendant 10 secondes, puis par l'acide chlorhydrique pendant 8 secondes et par les carbonates de lithium pendant 10secondes
- Laver à l'eau courante pendant 10secondes, puis déshydrater dans un bain d'alcool de 95° pendant 1 min.
- Colorer à l'éosine pendant 05min pour colorer le cytoplasme, puis déshydrater les lames par l'alcool de 100% (deux bains) pendant 2min, puis dans toluène ou xylène pendant 2min
- Rincer à l'eau courante pendant 2 secondes.

Les lames préparées ont été couverte par des lamelles en verre, et observées au microscope optique (grossissement x40 et x100) afin d'évaluer la présence ou pas d'une hyperplasie de la synoviale, cellules inflammatoires, fibrose et destruction de l'espace articulaire et le cartilage.

3.9.5.6. Analyse statistique

Toutes les expérimentations ont été réalisées en duplicata. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart type ($\bar{X} \pm SEM$).

Le traitement des données est réalisé par l'application de l'ANOVA ou $P \leq 0.05$ est considéré comme significatif.

Résultats et discussion

2.1. Screening phytochimique

C'est l'ensemble de tests préliminaires basés sur des réactions colorées ou des précipitations obtenues par des réactifs chimiques spécifiques nous ont permis de mettre en évidence la présence de quelques métabolites secondaires d'*A. longa*.

Le tableau 12 révèle que la plante *A.longa* contient quatre groupes de composants bioactifs : flavonoïdes, tanins, saponines et coumarines dans les feuilles et racines. En Plus de ces molécules bioactives, les feuilles d'*A.longa* contiennent les stéroïdes, alors que nous notons l'absence des terpénoïdes et les alcaloïdes dans les feuilles et les racines.

Tableau 12 : Constituants phytochimique de la plante *A. longa*

Métabolites secondaires	Feuilles	Racines
Coumarines	+++	+++
Terpénoïdes	-	-
Alcaloïdes	-	-
Saponines	+++	+
Stéroïdes	+++	-
Tanins	+	++
Flavonoïdes	+++	+

++:Extrêmement présence;+: Présence; - : Absence

Les résultats de l'étude de Meraouni et ses collaborateurs (2017) ont montré des résultats comparables à notre étude par la présence de flavonoïdes et tanins. Alors que l'analyse réalisée par Benarba *et al* (2014) sur l'extrait aqueux de racines d'*A. longa*, a montré la présence des triterpènes et l'absence des coumarines et saponosides. L'absence des alcaloïdes et terpenoïdes pourrait être expliquée par la technique suivie pour leur recherche, la quantité de la matière végétale utilisée, ainsi que la méthode d'extraction.

2.2. Rendements d'extraction

2.2.1. Rendements d'extraction des extraits bruts

Afin de déterminer la teneur en polyphénols totaux de la plante, des extraits bruts ont été préparés à partir des feuilles et des racines en utilisant deux solvants, le méthanol et l'acétone.

Le rendement des extraits bruts flavonoïdiques ($12.58 \pm 1.5\%$ et $9.05 \pm 0.5\%$) des feuilles et racines d'*A. longa*, sont plus élevés que les extraits bruts tanniques. En revanche, le rendement en extrait brut tannique des racines était le moins élevé ($6.7 \pm 0.3\%$) par rapport aux autres rendements (tableau 13).

Selon les travaux réalisés par Merouani *et al* (2017) sur la même espèce, de forts rendements ont été enregistrés pour les extraits aqueux de fruits (10.05%), suivi par l'extrait aqueux de la partie aérienne (8.65%), ce qui est en concordance avec nos résultats.

Tableau 13 : Aspect, couleur et rendements des extraits bruts

Partie	Extrait brut	Aspect	couleur	Rendement(%)
Feuilles	flavonoïdique	pâteux	vert	12.58 ± 1.5
	tannique	pâteux	vert	7.2 ± 0.12
Racines	Flavonoïdique	poudre	Jaune	9.05 ± 0.5
	tannique	poudre	Jaune	6.7 ± 0.3

En effet, le rendement d'extraction varie de plante à l'autre et même d'une partie à l'autre, en fonction des solvants utilisés dans l'extraction, le volume des solvants, ces polarités, le temps et la température d'extraction, les conditions de séchage, les conditions climatiques et le contenu des composés actifs (khaled –Khodja *et al*,2014 ;Mohammedi ,2013).

2.2.2. Rendements d'extraction des différentes fractions

L'utilisation de deux solvants méthanol et acétone, nous ont permis d'extraire les flavonoïdes et les tanins. Les solvants organiques éther diéthylique, acétate d'éthyle et le n-butanol permettent une première sélection et séparation des métabolites. Chaque fraction va contenir un ou plusieurs types moléculaires, qui sont soit solubles ou non dans l'éther diéthylique pour donner la fraction (E-D), soit solubles dans l'acétate d'éthyle et on parle de la fraction acétate d'éthyle (A-D), soit très ou solubles dans le n-butanol pour donner la fraction butanolique (N-B). Les métabolites, qui ne sont entraînés ni par l'un ou l'autre restent solubles dans l'eau et constitue la fraction aqueuse résiduelle (A-Q) (Mohammedi, 2013).

En effet, l'extraction des flavonoïdes et les tanins par la méthode d'affrontement par les solvants organiques à partir de la poudre de feuilles et racines d'*A. longa*, nous a permis d'obtenir 16 fractions. Les résultats illustrés dans le tableau 13, montrent que l'extrait de fraction aqueuse flavonoïdique des racines représente le rendement le plus élevé (6.67 ± 0.8 %) suivi par l'extrait de fraction n-butanol flavonoïdique des feuilles (6.50 ± 0.1 %). Le rendement le plus faible (0.11 ± 0.08 %) est obtenu par l'extrait d'éther éthylique tannique de racines. (Tableau 14)

Tableau 14 : Aspect, couleur et rendements des extraits après fractionnement

Extrait	Partie	Aspect	couleur	Rendement(%)
E-D flavonoïdique	Feuilles	Pâteux	Marron foncé	2.57 ± 0.02
	Racines	Pâteux	Marron foncé	1.51 ± 0.7
A-D flavonoïdique	Feuilles	poudre	Marron	2.23 ± 0.5
	Racines	Poudre	Marron	0.78 ± 0.04
N-B flavonoïdique	Feuilles	Poudre	Marron clair	6.50 ± 0.1
	Racines	Poudre	Marron clair	1.07 ± 0.24
A-Q flavonoïdique	Feuilles	Pâteux	Marron foncé	6.67 ± 0.8
	Racines	Pâteux	Marron foncé	7.65 ± 0.02
E-D tannique	Feuilles	pâteux	Marron clair	0.5 ± 0.04
	Racines	pâteux	Marron clair	0.11 ± 0.08
A-D tannique	Feuilles	poudre	Marron jaunâtre	0.26 ± 0.02
	Racines	poudre	Marron jaunâtre	1.15 ± 0.12
N-B tannique	Feuilles	poudre	Brun Jaunâtre	0.26 ± 0.02
	Racines	poudre	Brun Jaunâtre	5.15 ± 0.47
A-Q tannique	Feuilles	Pâteux	Jaune blanchâtre	0.35 ± 0.13
	Racines	Pâteux	Jaune blanchâtre	0.21 ± 0.31

E-D : Extrait de fraction Ether diéthylique, **A-D :**Extrait de fraction Acétate d'éthyl, **N-B :** Extrait de fraction n-butanol, **A-Q :**Extrait de fraction aqueuse

Les variations observées dans les rendements des fractions peuvent être dues à la partie de plante utilisée, aux volumes des solvants utilisés dans le fractionnement et au temps de fractionnement.

D'une manière générale, l'extraction de composés polyphénoliques est une étape cruciale pour la récupération des principes actifs, elle dépend de la méthode utilisée et du solvant approprié préservant leurs propriétés biologiques (Guinnin *et al.*, 2016).

2.3. Analyse colorimétrique et spectrophotométrique des extraits bruts et fractions

Les composés phénoliques tel que les polyphénols, les flavonoïdes et les tanins sont des phytoconstituants les plus importants chez les plantes et présentent de nombreux avantages pour la santé. Ils sont synthétisés par les plantes non seulement au cours de leur développement, mais aussi en réponse à des conditions de stress comme les infections, les blessures, les rayons UV (Lawrence et Gilroy, 2008 ;Guinnin *et al.*,2016).

Les différents extraits bruts et fractions ont été analysés quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour leur contenu en polyphénols, flavonoïdes et tanins.

2.3.1. Teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins des extraits bruts

Les résultats des analyses colorimétrique des extraits bruts (tableau 15), indiquent que les feuilles d'*A.longa* possèdent des teneurs élevées en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux (8.580±0.04 mg GAE/gMS et 8.011±0.06 mg CA/gMS) respectivement. Leur teneur en tanins est faible (5.058±0.06 QUE/g MS). Alors que la composition des racines d'*A.longa* en polyphénols et flavonoïdes est faible par contre riche en tanins (6.117±1.47 QUE/g MS), ce qui est en concordance avec les résultats obtenus par Djeridane et ses collaborateurs (2006) sur l'extrait acétate d'éthyle des racines de la même espèce avec des teneurs en polyphénols(1.47±0.02mg AG/g MS)et flavonoïdes (0.81±0.02RE/g MS) respectivement. Par contre des teneurs les plus élevées en polyphénols, flavonoïdes et tanins ont été trouvées par Merouani *et al.*,(2017) sur les extraits méthanolique et acétonique de la partie aérienne d'*A.longa*.

Tableau 15: Dosage des polyphénols totaux, flavonoïdes totaux et tanins totaux dans les extraits bruts des feuilles et racines d'*A. longa*

Composés phénoliques Partie	Polyphénols totaux (mg GAE/g MS) ^a	Flavonoïdes totaux (mg CA/g MS) ^b	Tanins totaux (mg QUE/g MS) ^c
Feuilles	8.580±0.04	8.011±0.06	5.058±0.06
Racines	8.183±0.51	5.423±0.47	6.117±0.47

a : mg équivalent à l'acide gallique /g de la matière sèche, **b** : mg équivalent à la catéchine /g de la matière sèche, **c** : mg de équivalent à la quercetine /g de la matière sèche

En général, la variation en composés phénoliques des extraits de la plante est due à leur origine, la saison de récolte, les conditions climatiques et environnementales, la localisation géographique, les différentes maladies qui peuvent affecter la plante, la maturité de la plante, ainsi la méthode d'extraction et les solvants utilisés (Ebrahimzadeh *et al*, 2010)

2.3.2. Teneur en flavonoïdes et Tanins condensés de différentes fractions

Les résultats représentés dans le tableau 16, montrent que les teneurs en flavonoïdes varient considérablement entre les extraits de fractions, avec un minimum de (0.30±0.41mg CA/g MS) enregistré par l'extrait de la fraction A-Q des feuilles d'*A.longa* et un maximum de (4.54±0.94mg CA/g MS) obtenu par la fraction N-B des feuilles de la même plante.

En ce qui concerne, les teneurs en tanins, elles sont présentées en quantités remarquables dans les fractions acétate d'éthyle (A-D) et n-butanol (N-B) des feuilles et racines d'*A.longa*. Les teneurs enregistrées sont dans l'ordre : N-B de racines (3.90±0.24mg QUE/g MS) > A-D de feuilles (3.03±0.01mg QUE/g MS) > A-D des racines (2.75±0.24mg QUE/g MS) > E-D des racines (1.876±0.02mg QUE/g MS) > A-D de feuilles (1.38±0.05mg QUE/g MS), alors que les extraits de fraction aqueuse des racines et feuilles ont une teneur très faibles (0.20±0.07mg QUE/g MS et 0.57±0.01mg QUE/g MS respectivement).

Tableau 16 : Dosage des flavonoïdes et tanins condensés dans les extraits des fractions des feuilles et racines d'*A. longa*

Partie	Fraction	Teneur en Flavonoïdes (mg CA/g MS)	Teneur en Tanins (mg QUE/g MS)
Feuilles	E-D	1.18±0.02	0.66±0.04
	A-D	3.05±0.22	3.03±0.01
	N-B	4.54±0.94	1.38±0.05
	A-Q	0.30±0.41	0.20±0.07
Racines	E-D	0.85±0.047	1.876±0.02
	A-D	1.45±0.31	2.75±0.24
	N-B	2.87±0.42	3.90±0.24
	A-Q	0.7±0.40	0.57±0.01

E-D : Extrait de fraction éther diéthylique, **A-D :** Extrait de fraction acétate d'éthyle, **N-B :** Extrait de fraction n-butanol, **A-Q :** Extrait de fraction aqueuse

La richesse des fractions acétate d'éthyle et n-butanol en flavonoïdes et tanins, est due à l'épuisement des composés phénolique des extraits bruts par les solvants organiques utilisés pendant le fractionnement, ce qui explique également, la présence des flavonoïdes et tanins en quantités faibles dans les fractions aqueuses (Mohammedi, 2013).

En revanche, la variabilité dans les quantités des composés phénoliques entre les extraits de fractions peut être attribuée à la nature du solvant utilisé pour l'extraction et fractionnement (Mohammedi, 2013).

En règle générale, la solubilité des composés phénoliques (flavonoïdes, tanins) due principalement à la polarité du solvant d'extraction, au degré de polymérisation des molécules à extraire, à la longueur des chaînes carboniques et au nombre et la position des groupements hydroxyles (Naczka et Shahidi, 2004 ; Iloki-Assanga *et al.*, 2015). L'interaction possible de ces molécules de base avec d'autres constituants et la formation probable de complexes insolubles peuvent aussi influencer la solubilisation de ces composés (Djeridane *et al.*, 2006). L'extraction des tanins condensés dépend de la nature chimique du solvant utilisé et aux conditions de fonctionnement (Chavan *et al.*, 2001)

Pour chaque espèce végétale et au sein de la même espèce, la nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction. Ces activités sont étroitement liées à la teneur de la substance ou à l'ensemble des substances biologiquement actives (Mohammadi, 2013).

2.4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits des fractions

Afin de confirmer ce qui est établie dans littérature sur le pouvoir antioxydant de notre plante et pour caractériser ce potentiel, nous avons testé l'activité antioxydante des flavonoïdes et tanins présentés dans les feuilles et les racines de la plante *A longa* en utilisant deux tests différents : piégeage du radical libre (DPPH) et pouvoir réducteur des ions ferriques (FRAP). Ce qui nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

2.4.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl(DPPH)

La méthode de DPPH détermine la capacité de piégeage des radicaux libres ou le potentiel antioxydant de l'échantillon testé, ce qui montre son efficacité, son mécanisme de prévention et de réparation contre les lésions dans un système biologique (Rashmika et Manish, 2012). En outre, la lecture des résultats à partir des profils de l'activité antioxydante, révèle que la réaction de l'acide ascorbique et les radicaux de DPPH est rapide et instantanée, le changement de couleur du violet au jaune exprime le passage du DPPH de la forme radical (DPPH[•]) à la forme réduite stable (DPPH-H)(Ziane, 2016)

Le pouvoir antioxydant exercé sur le radical libre DPPH par les extraits des fractions est exprimé par les pourcentages d'inhibitions (PI%) et sont traduits par les profils d'activité antioxydante illustrés dans la figure 21.

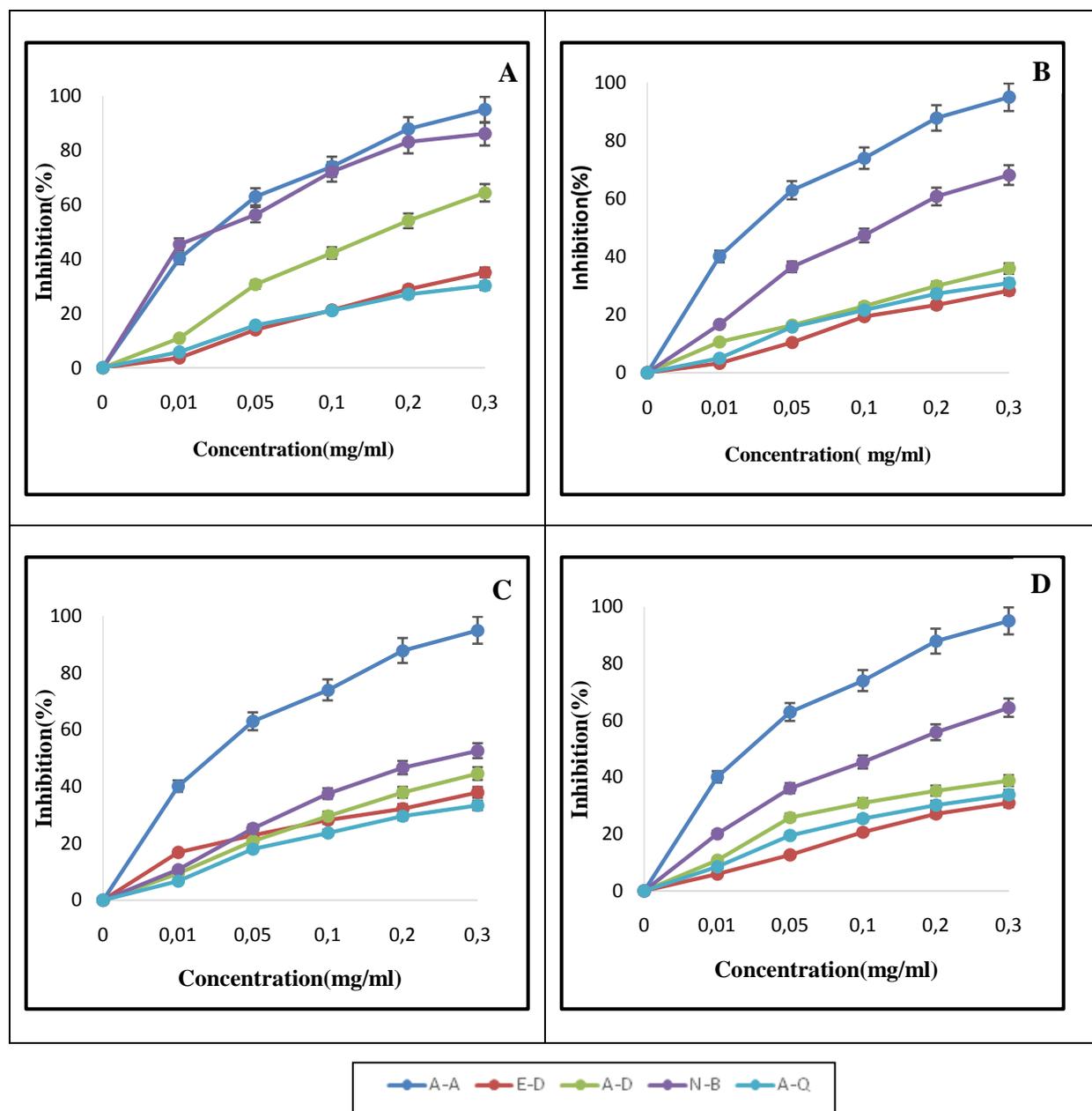


Figure 21. Pourcentage d'inhibition de DPPH par les fractions de feuilles et racines d'*A. longa* ;(A) : Extraits des fractions flavonoïdique des feuilles,(B) :Extraits des fractions flavonoïdique des racines ;(C) : Extraits des fractions tannique des feuilles,(D) : Extraits des fractions tannique des racines.

D'après les résultats présentés sur la figure 21, les pourcentages d'inhibition des radicaux libres élaborés par les extraits des fractions croient avec l'augmentation de concentrations. Tandis que, les taux d'inhibition du DPPH enregistrés par les différents extraits sont inférieurs à ceux de l'acide ascorbique.

Les fractions de N-B flavonoïdique des feuilles et racines ont montré une meilleure activité antioxydante, elles sont de l'ordre de $90.83 \pm 1.38\%$ et $91.93 \pm 3.42\%$ respectivement, alors que la fraction N-B tannique de racines enregistre un pourcentage d'inhibition de $71.30 \pm 1.09\%$. En revanche la fraction d'acétate d'éthyle flavonoïdique et la fraction d'acétate d'éthyle tannique des feuilles atteignent des pourcentages d'inhibition égale à $78.23 \pm 1.04\%$ et $50.06 \pm 0.04\%$. Par contre les pourcentages d'inhibition de quatre (04) extraits de fraction aqueuse sont plus faibles, et varient entre $32.66 \pm 1.52\%$ et $37.67 \pm 0.695\%$.

Les IC₅₀ qui expriment les concentrations d'inhibition des extraits des fractions nécessaires pour diminuer 50% du taux des radicaux libres, sont représentées graphiquement par régression linéaire des pourcentages d'inhibitions, calculés en fonctions de différentes concentrations. Nous rappelons que la fraction possédant la valeur IC₅₀ la plus basse, exerce une activité anti-radicalaire la plus forte.

Les résultats d'IC₅₀ indiqués dans la figure 22, montrent que les valeurs d'IC₅₀ des fractions varient entre 4.93 ± 1.37 mg/ml et 0.044 ± 0.001 mg/ml. Le pouvoir antioxydant puissant est retrouvé chez la fraction N-B flavonoïdique des feuilles avec une valeur de l'ordre de 0.044 ± 0.001 mg/ml, suivi par la fraction N-B flavonoïdique des racines (0.096 ± 0.007 mg/ml) et la fraction N-B tannique des racines (0.123 ± 0.009 mg/ml).

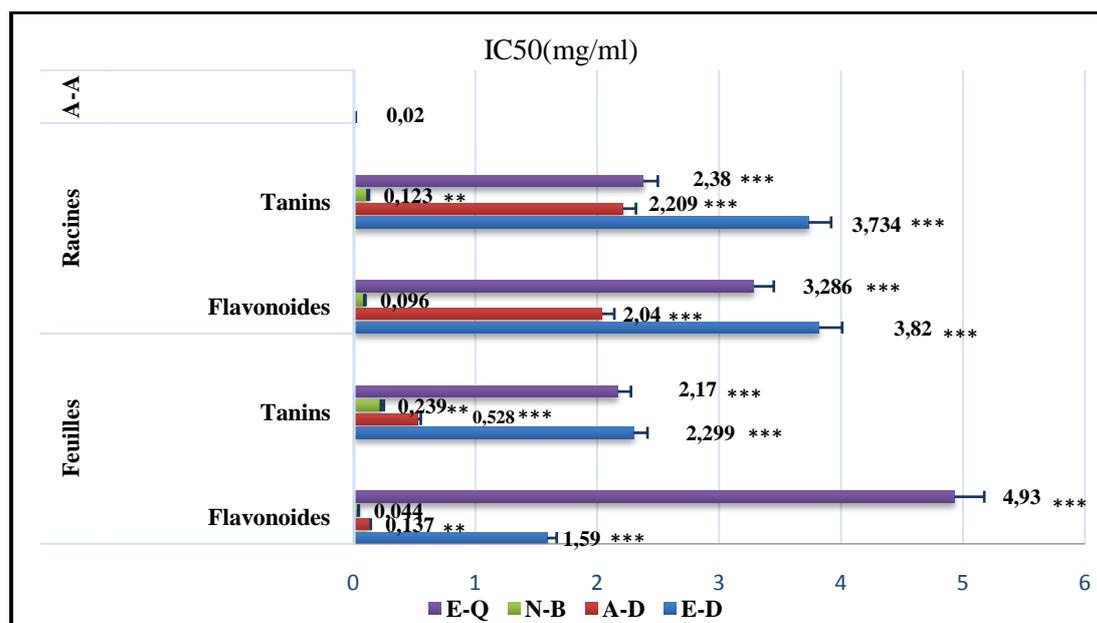


Figure 22 : IC50 des différentes fractions flavonoïdiques et tanniques des feuilles et racines de la plante *A. longa* en mg/ml. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 3). ***: p < 0.001, **: p < 0. 01 par rapport à l'acide ascorbique (A-A).

Les valeurs d'IC50 de la capacité antioxydante varient de manière significative de $3,82 \pm 0,93$ mg / ml à $0,096 \pm 0,007$ mg / ml par rapport à l'acide ascorbique ($0,02 \pm 0,0002$ mg / ml) (P < 0,05). Cependant, l'activité antioxydante de la fraction N-B flavonoïdique de feuilles (IC50 = $0,044 \pm 0,001$ mg / ml) est révélée non significative (p > 0,05). Cette variation de valeurs d'IC50 peut être expliquée par la présence d'une teneur élevée en flavonoïdes dans les feuilles d'*A. longa*.

Plusieurs études antérieures ont démontré que les espèces du genre *Aristolochia* sont riches en composés phénoliques tels que les flavonoïdes et les tannins. En effet, ils sont responsables de nombreuses activités biologiques (Jegadeeswari *et al.*, 2014; Guinnin *et al.*, 2016). L'étude réalisée par Djeridane et ses collaborateurs (2010), sur la partie aérienne d'*A. longa* a montré que l'effet antiradicalaire est donné par la fraction acétate d'éthyle avec une valeur de $10,63 \pm 0,02$ mg/l. Cette valeur est proche à celle que nous avons obtenue pour la fraction N-B flavonoïdique de feuilles. Par contre une meilleure activité antioxydante a été remarquée par Merouani *et al* (2017) sur l'extrait méthanolique de feuilles ($55,04 \pm 1,29$ μ g / ml).

On peut conclure que la puissance de l'activité antiradicalaire est proportionnelle à la richesse des fractions en flavonoïdes et /ou tanins. De plus, la différence du potentiel antioxydant entre les fractions testées peut être expliquée par la dépendance, la nature physico-chimique des composés bioactifs présents dans les extraits de fractions, et par la différence de sélectivité du solvant pour extraire certains groupes antioxydants (Djeridane *et al.* 2006).

D'ailleurs, certaines structures de flavonoïdes et en particulier la position de l'hydroxyle dans la molécule détermine leurs propriétés antioxydantes. En général, ces propriétés dépendent de la capacité de donner un hydrogène ou un électron au radical libre (djeridane *et al.*, 2006).

En effet, de nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité antioxydante. Les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'-4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3 OH sur le cycle C (Amic *et al.*, 2003). Les tanins possèdent également des propriétés antioxydantes significatives et agissent comme capteurs et donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits lors de la peroxydation. (Mohammedi,2013)

2. 4.2. Le pouvoir réducteur des ions ferrique (FRAP)

Le principe de la méthode de FRAP est d'évaluer la capacité de réduction du fer ferrique (F^{3+}) au fer ferreux (F^{2+}) par les antioxydants présentés dans les échantillons testés. Par conséquent, en mesurant la formation du complexe bleu à 700 nm. Une absorbance plus élevée indique également un pouvoir réducteur plus élevé (Lillian *et al.* , 2016). La figure 23 montre la cinétique de cette activité de différentes fractions en fonction de l'absorbance.

Les profils de l'activité réductrice des ions ferrique ont démontré l'augmentation de cette dernière avec l'élévation de la concentration de l'échantillon testé. Les résultats montrent également que les fractions n-butanol des feuilles et racines ont un pouvoir réducteur important par rapport à celui enregistré par l'acide ascorbique sans négliger les fractions acétate d'éthyle des feuilles et des racines qui ont une activité remarquable. Ce potentiel antioxydant peut être dû à la présence des substances actives dans ces fractions

A partir des profils mentionnés au dessous, nous avons déterminé la valeur correspondante à l'EC50. Cette valeur est inversement liée à la capacité antioxydante d'un extrait. En effet, le pouvoir réducteur d'*A. longa* croit avec l'augmentation de la concentration de différentes fractions et varie entre 0.066 ± 0.002 mg / ml et $4,00 \pm 0,2$ mg / ml.

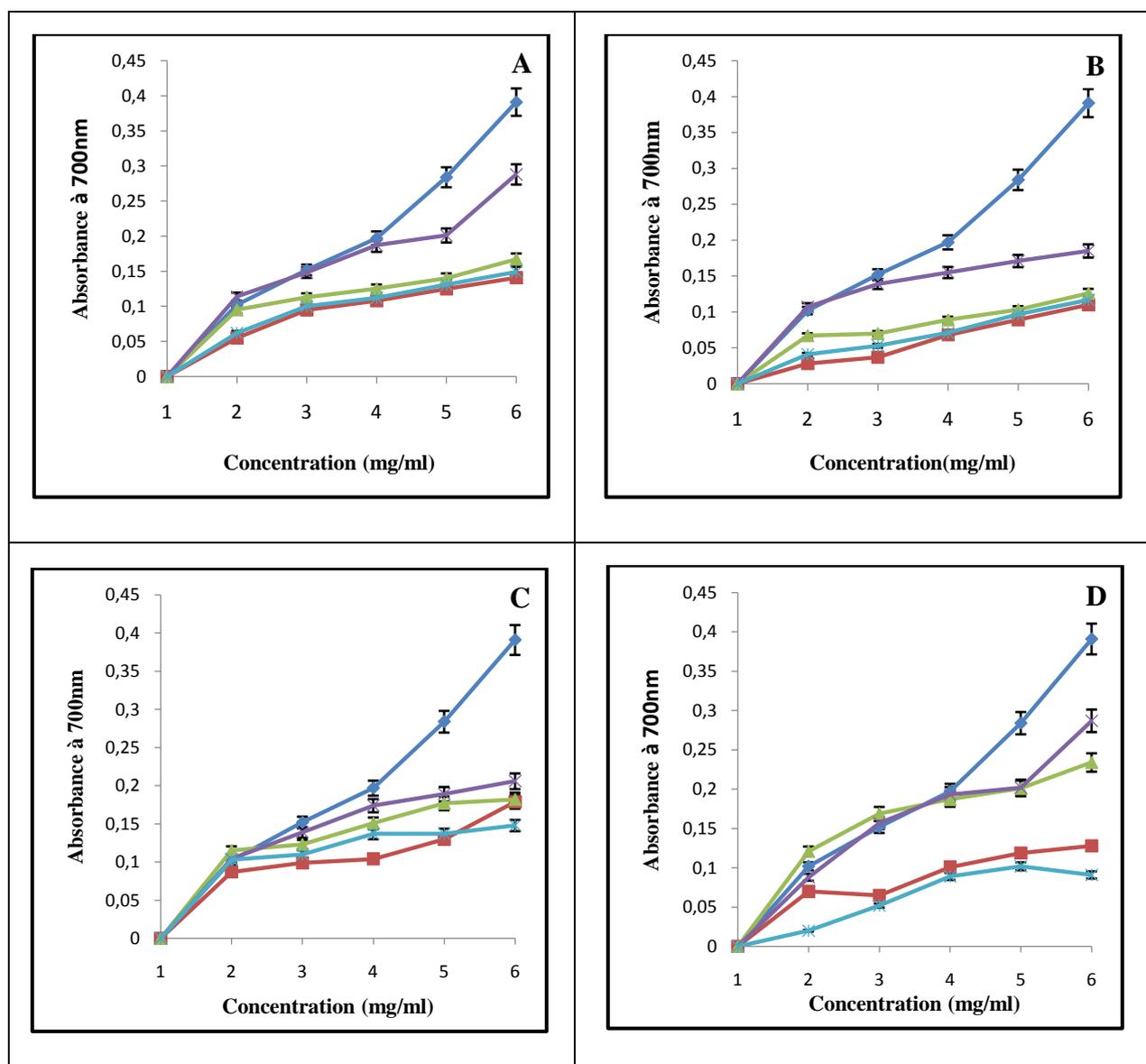


Figure 23 : Cinétique de l'activité réductrice des ions ferreux par les fractions des feuilles et racines d'*A. longa* ;(A) : Extraits des fractions flavonoidique des feuilles,(B) :Extraits des Fractions flavonoidique des racines ;(C) : Extraits des fractions tannique des feuilles,(D) : Extraits des fractions tannique des racines

Les résultats illustrés dans la figure 24 ont révélé que le pouvoir réducteur de fraction N-B flavonoïdique des feuilles, la fraction N-B tannique des feuilles et la fraction N-B tannique des racines est non significatif ($P > 0,05$) avec des valeurs respectives ($EC_{50} = 0,126 \pm 0,041$ mg / ml, $0,104 \pm 0,041$ mg / ml et $0,066 \pm 0,002$ mg / ml) par rapport à l'acide ascorbique ($EC_{50} = 0,051 \pm 0,009$ mg / ml). L'activité réductrice des fractions n-butanol de feuilles et racines citées précédemment est probablement due à la concentration de composés antioxydants en particulier les flavonoïdes et tanins.

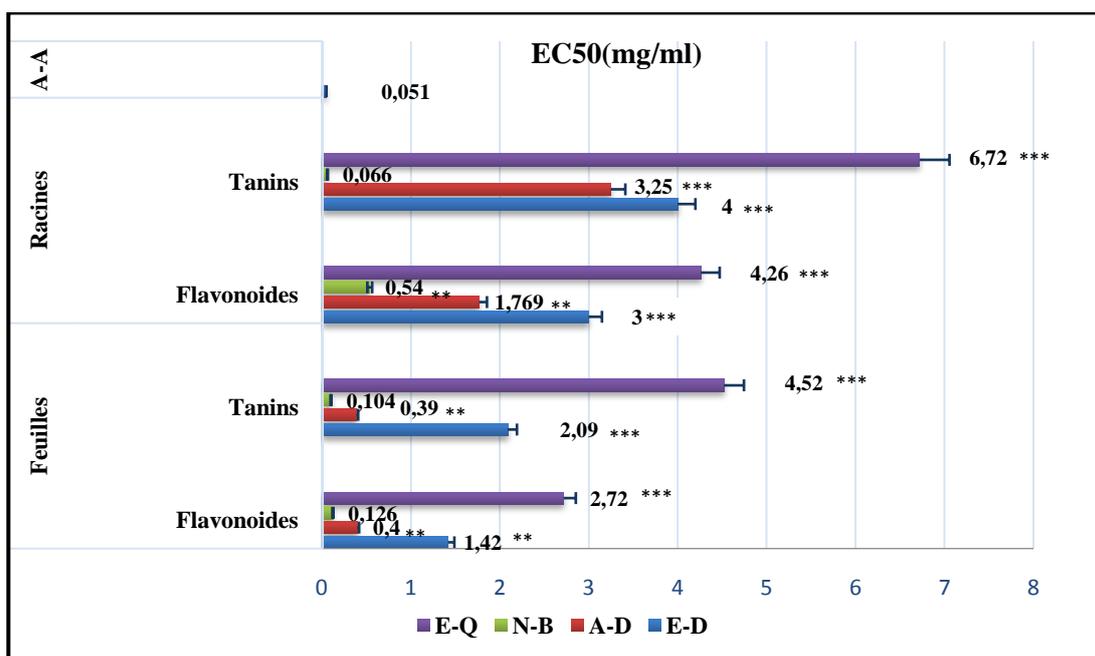


Figure 24 : EC_{50} des fractions de feuilles et racines d'*A. longa* en mg/ml. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 3) ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$ par rapport à l'acide ascorbique.

L'étude menée par Merouani *et al*(2017) confirme que la plante *A. longa* a une activité antioxydante importante, et que l'extrait méthanolique de la partie aérienne présente la meilleure activité réductrice avec une valeur d' $EC_{50} = 0,2 \pm 0,019$ mg / ml. Ce potentiel a été remarqué par Jegadeeswari et ses collaborateurs(2014) chez trois extraits (méthanolique, éthanolique et acétate d'éthyle) d'*A. Bracteata*.

Nos résultats sont en concordance avec les travaux antérieurs réalisés sur plante *A. longa* et même sur d'autres espèces de la même famille avec une différence dans la puissance et l'importance de cette activité.

Sans doute, les résultats obtenus par le test de FRAP, sont similaires à ceux enregistrés par la méthode de DPPH. Cette ressemblance est due certainement au mécanisme des réactions mises en jeu comme le transfert d'électrons (Beddou, 2015). Par ailleurs, l'activité antioxydante dépend non seulement de la concentration, mais également de la structure et de la nature des antioxydants trouvés dans la plante (Falleh *et al.*, 2008).

2.5. Analyse Chromatographique par HPLC-DAD-ESI-MS.

Les résultats obtenus par l'estimation des teneurs en flavonoïdes et tanins pour différentes fractions et ceux enregistrés par l'évaluation de l'activité antioxydante (DPPH.FRAP), nous a permis de sélectionner 04 fractions qui ont des teneurs importantes en flavonoïdes et tanins et une activité antioxydante remarquable. Au vu ces données, les fractions N-butanol flavonoidique et tannique des feuilles et racines ont subis une identification qualitative par l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse (MS).

Cette étude nous a permis d'identifier les différents composés phénoliques et de confirmer la présence de flavonoïdes et tanins dans les fractions choisies.

Les résultats de l'analyse qualitative par l'HPLC de notre plante sont présentés dans les chromatogrammes indiqués au-dessous (Figures 25-26-27 et 28).

Les caractéristiques chromatographiques des principaux composés détectés des quatre fractions choisies sont présentés dans les tableaux 17 et 18. Le reste des pics non cités sur les tableaux correspondent aux composés non identifiés.

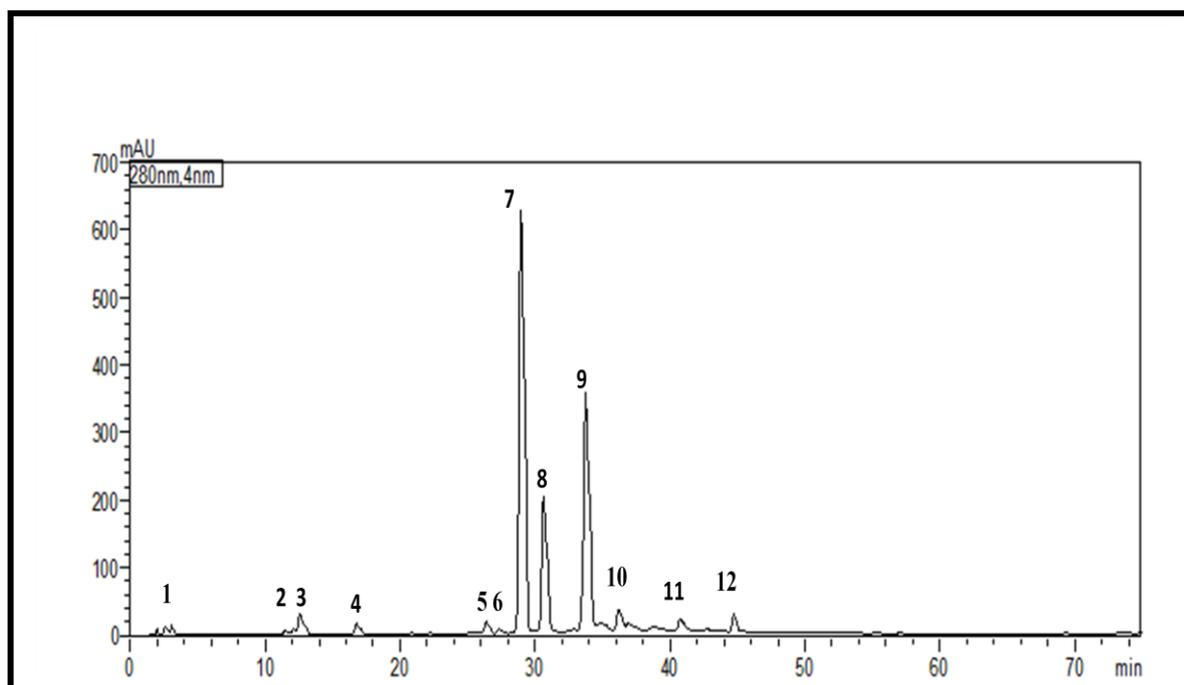


Figure 25 : Chromatogramme d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction n-butanol flavonoïdique des feuilles d'*A.longa*

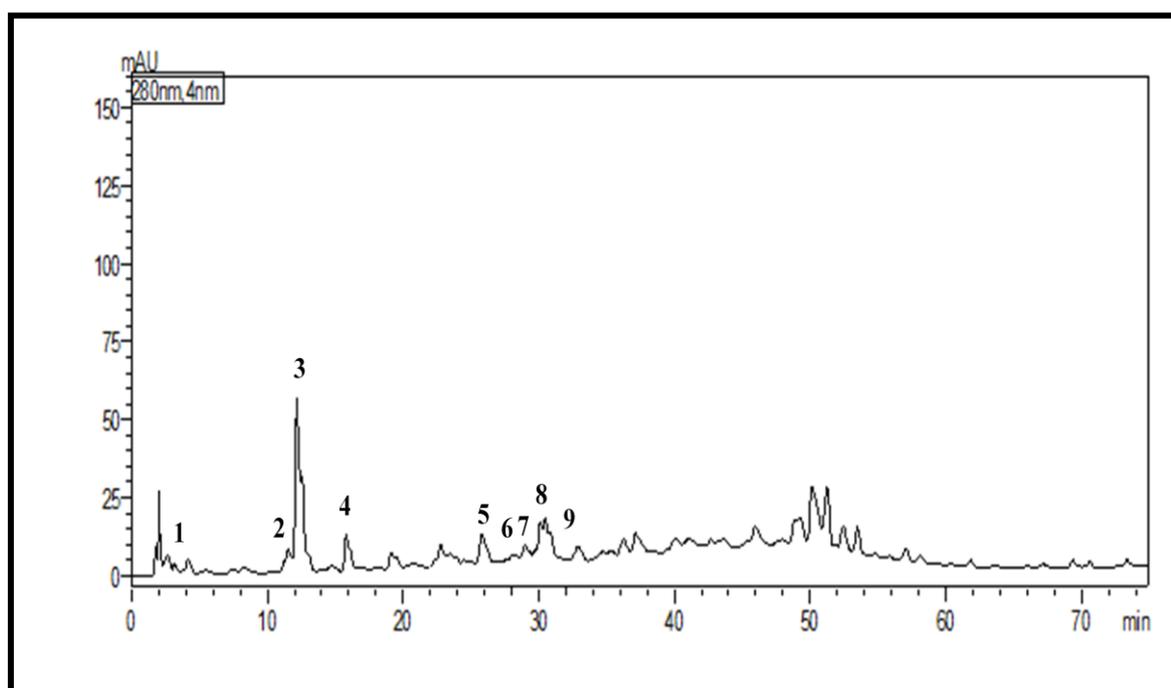


Figure 26 : Chromatogramme d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction n-butanol flavonoïdique des racines d'*A.longa*

Tableau17. Identification par HPLC /ESI /MS des composés phénoliques des fractions n-butanol flavonoïdique des feuilles et racines d'*A.longa*

Pic	T.R	λ max	MH ⁻	Pourcentage (%)		Composant
				Feuilles	Racines	
01	3.094	195-261	341	0,45	1,190	Caffeoylhexoside
02	11.712	260	197	0,361	0,815	Acide quinique
03	12.78	217-277	315	2,16	7,557	Acide Protocatechuique hexoside
04	16.77	266-330	353	1,04	2.085	Acide 3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinique
05	26.37	268-348	593	1,132	-	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside
06	27.32	271-332	271	0,471	0.77	Naringenin- <i>O</i> -glucoside
07	28,84	270-336	431	40,55	1,514	Apigenin-8- <i>C</i> -hexoside
08	30,88	268-349	447	13,28	2,008	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside
09	34,012	270-337	431	25,790	1,93	Apigenin-7- <i>O</i> -glucoside
10	36,38	273-327	515	2,446	3,68	Acide 3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinique
11	40,906	274-341	639	1,814	-	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -di-glucoside
12	44,78	275-333	593	1,395	-	Apigenin 6,8-di- <i>C</i> -glucoside

Le chromatogramme obtenu de fraction n-butanol flavonoïdique des feuilles (figure 25) nous a permis d'identifier douze composés bioactifs (tableau16) : quatre acides phénolique (acide quinique, acide protocatéchiue hexoside, acide 3,5-Di-*O*-cafféoylquinique et acide 3,5 -Di-*O*-cafféine quinoléique) et huit flavonoïdes (Cafféoylhexoside, Kaempférol-3-*O*-rutinoside, Naringénine-*O*-glucoside, Apigénine-8-*C*-hexoside, Kaempférol-3-*O*-glucoside, Apigénine-7-*O*- glucoside, Isorhamnetin-3-*O*-diglucoside et Apigenin 6,8-di-*C*-glucoside). L'apigénine-8-*C*-hexoside (40,55%), Apigenin-7-*O*-glucoside (13,28%) et kaempférol-3-*O*-glucoside (25,790%) sont les principaux composants.

Le profil phénolique de la fraction n-butanol flavonoïdique des racines (figure 26) été moins important que celui des feuilles, seuls 09 composés phénoliques ont été identifiés (tableau 17). Les acides phénoliques sont présentés par l'acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique, l'acide protocatéchique et l'acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique. Les flavonoïdes : kaempférol-3-*O*-glucoside (15,04%) et de l'Apigénine-7-*O*-glucoside (9,87%), alors que kaempférol-3-*O*-rutinoside, isorhamnetin-3-*O*-di-glucoside et Apigénin 6, 8-Di-*C*-glucoside sont absents dans les racines.

Cette différence dans la composition chimique en flavonoïdes entre les feuilles et les racines est dû probablement au solvant utilisé et à la méthode d'extraction. En effet la présence de trois flavonoïdes majeurs dans les feuilles explique le potentiel antioxydant de la fraction n-butanol flavonoïdique. Plusieurs études ont démontré que les kaempférols glucosidiques ont une activité antioxydante non seulement *in vitro*, mais aussi *in vivo* (Aniya *et al*, 2005 ; Kampkotter *et al*, 2007).

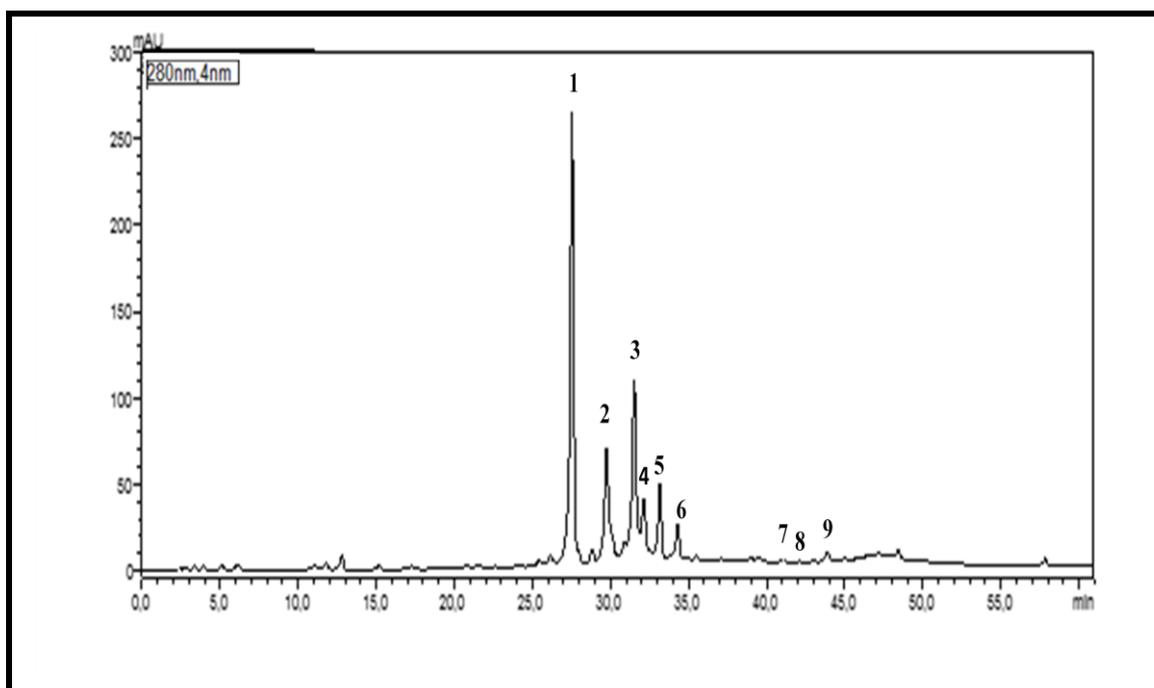


Figure 27 : Chromatogramme d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction n-butanol tannique des feuilles d'*A. longa*

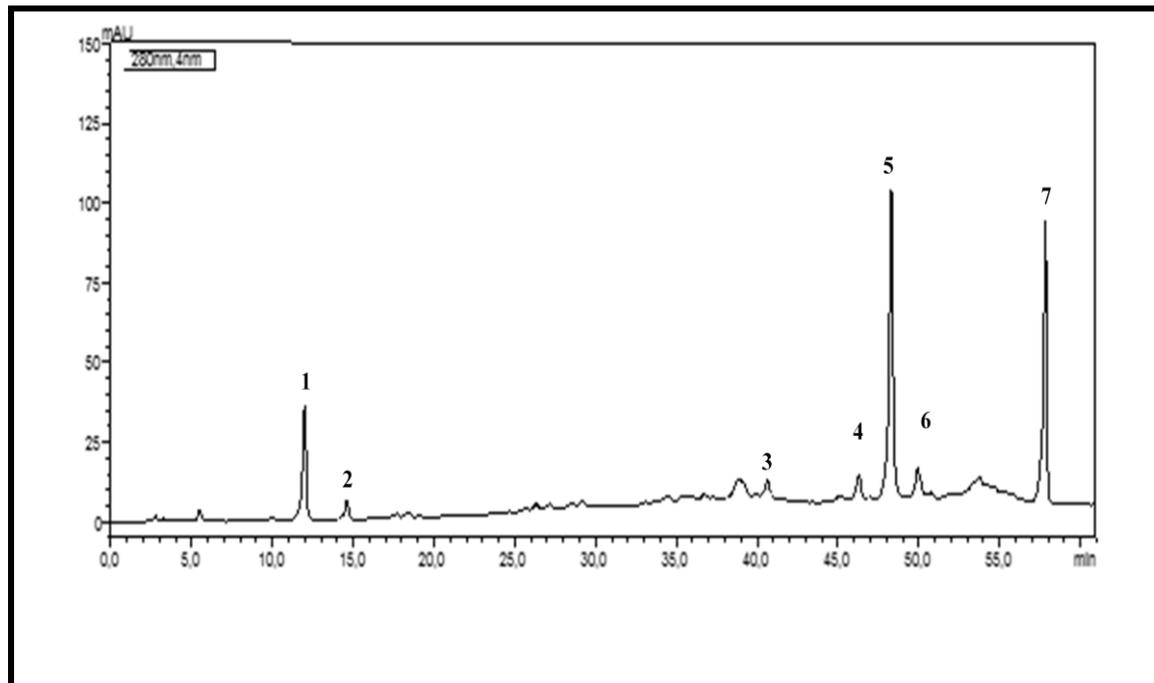


Figure 28 : Chromatogramme d'HPLC-DAD-ESI-MS de la fraction n-butanol tannique des racines d'*A. longa*

Tableau 18 .Identification par HPLC /ESI /MS des composés phénolique des fractions n-butanol tannique des feuilles et racines d'*A.longa*

	Pic	TR	λ max	MH	(%)	Composant	Reference
Feuilles	1	27,53	270-336	431	32,33	Apigenin-8-C-hexoside	Brito <i>et al</i> (2014)
	2	29,74	332	271	12,49	Naringinine –O-glucoside	Pereira <i>et al.</i> (2013)
	3	31,52	268-349	447	15,11	Kaempferol-3-O-glucoside	Tomaz et Maslov (2015)
	4	32,12	320	353	5,62	Acide chlorongenique	Vagiri <i>et al</i> (2012) ; Tomaz et Maslov(2015)
	5	33,16	245	305	5,91	Epigallocatechine	Wang <i>et al</i> (2008)
	6	34,30	260	197	3,56	Acide quinique	Simirgiotis (2015)
	7	41,11	328-330	359	0,155	Acide rosmarinique	Pereira <i>et al</i> (2013)
	8	42,9	271	495,1	0,147	Acide 1,5 -di O gallyolquinique	Sannomiya <i>et al</i> (2005); Clifford <i>et al</i> (2007)
	9	44,97	292-313	647	0,64	Acide 1,3,4- tri-O gallogliquinique	Sannomiya <i>et al</i> (2005) ; Clifford <i>et al</i> (2007)
Racines	1	11,99	245	305	7,55	Epigallocatechine	Wang <i>et al</i> (2008)
	2	14,61	236-286	915	1,26	RoburinD	Bargiacchi(2017)
	3	40,62	320	182	2,47	Acide tanique	Agar <i>et al</i> (2015)
	4	46,30	266	631	2.77	Myricetine gallyolgalactoside	Romani <i>et al</i> (2012)
	5	48,3	292-471	647	23,47	1,3,4 -tri-O gallogliquinique	Sannomiya <i>et al</i> (2005) ; Clifford <i>et al</i> (2007)
	6	49,9	256	771	3,99	Quercetine-Rhamno-di-hoxoside	Inbaraj <i>et al</i> (2010)
	7	57,84	224-275	933	16,47	Vescalagin	Bargiacchi (2017) ;

Les chromatogrammes des l'extraits des fractions n-butanol tanniques des feuilles et racines d'*A.longa* sont présentés dans les figures 27 et 28.

Les caractéristiques chromatographiques des principaux composés détectés dans les extraits de la fraction n-butanol tannique de feuilles et racines sont rapportés dans le tableau 18.

Le profil chromatographique de l'extrait de fraction n-butanol tannique des feuilles nous a permis d'identifier 03 acides phénoliques (acide chlorongénique, acide quinique et acide rosmarinique, trois tanins (Epigallocatechine, acide 1,5 -di *O* gallyolquinique et acide 1,3,4-tri-*O* gallogliquinique). Les flavonoïdes sont présentés par l'Apigenin-8-C-hexoside, Kaempferol-3-*O*-glucoside et Naringinine -*O*-glucoside .Ces dernières sont les principales composantes avec un pourcentage de 32,33%, 15,11%, 12,49% respectivement.

Alors que le profil chromatographique de l'extrait de fraction n-butanol tannique des racines d'*A.longa* a révélé la présence d'un acide phénolique : Acide tannique et six tanins :Epigallocatechine, Myricetine gallyolgalactoside , Vescalagin et Roburin D dont les principales composants identifiés sont l'acide 1,3,4 -tri-*O* gallogliquinique (23,47%) et Vescalagin (16,47%).

Certains de ces composés phénoliques identifiés dans notre étude étaient également déterminés par El Omari *et al*(2020) chez la même espèce .On cite comme exemple l'acide quinique, acide chlorongénique ,acide rosmarinique ,kaempférol. epigallocatechin, et la quercétine.

Les profils chromatographiques montrent que les feuilles contiennent la plus grande quantité de flavonoïdes et les racines la plus grande quantité de tanins .Ces résultats nous ont conduit à sélectionner deux extraits pour l'étude *in vivo* : la fraction n-butanol flavonoïdique des feuilles et la fraction n-butanol tannique des racines.

2.6. Toxicité cutanée aigue

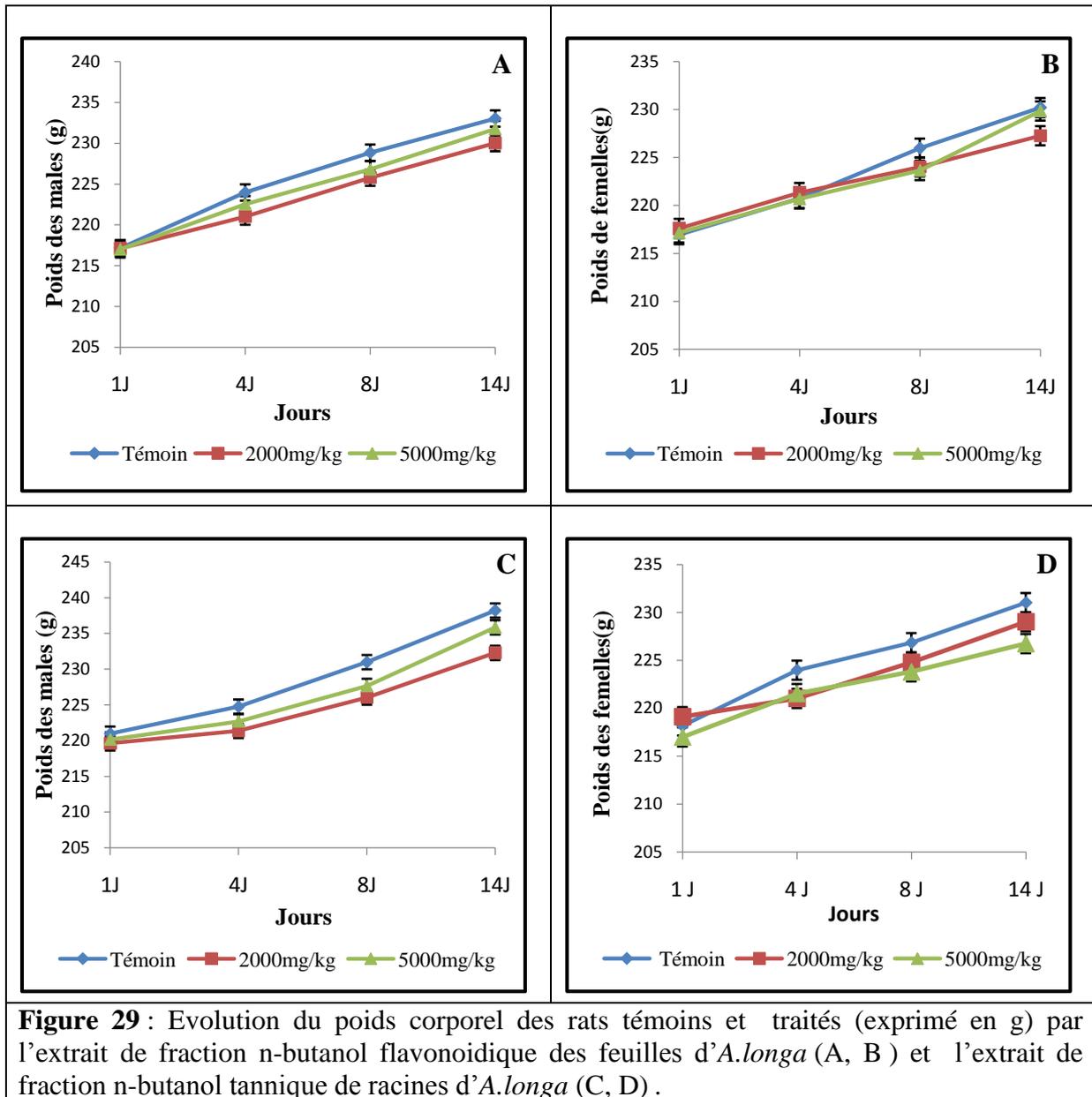
L'étude de la toxicité cutanée aigue est pour but d'établir des connaissances scientifiques sur notre plante et d'évaluer l'innocuité d'une substance chimique. Elle permet de révéler et définir les effets indésirables et secondaires qui apparaissent à la suite d'une administration unique d'une dose du produit au cours de 24 heures .La dose létale(DL50) est définit comme étant la quantité de substance qui tue 50% des animaux testés, elle est exprimée en milligramme en kilogramme d'animale.

- **Observation clinique**

Après l'administration des extraits des fractions choisis à des doses uniques et au cours de la période d'expérimentation (14 jours), aucun symptômes cliniques graves ni de changements dans le comportement ont été observés. Ces résultats nous permettent de conclure que notre plante ne possède aucune toxicité aigue cutanée chez les rats.

- **Evolution du poids des rats**

L'application des extraits des fractions n-butanol flavonoïdique et tannique d'*A.longa* par voie cutanée aux doses 2000mg/kg et 5000mg/kg pendant 14 jours n'a pas perturbé la croissance des rats et n'a présenté aucun effet létal (Figure 29). Aucune mortalité ni morbidité n'a été enregistrée chez les rats soumis au traitement par voie locale .Néanmoins, une différence mais non significative a été observée entre la croissance des rats de groupe témoin et celle des rats de groupes traités.



2.7. Etude de la formulation galénique

Afin de garantir la qualité de nos formulations, il était nécessaire de réaliser des tests de caractères macroscopiques et des contrôles microbiologiques avant leur utilisation. Ces contrôles incluent généralement le contrôle de la stabilité (test de l'efficacité de la conservation). Les résultats obtenus sont comme suit :

2.7.1. Caractères macroscopiques et organoleptique

- **Consistance, odeur et couleur**

Les formulations préparées avec l'extrait de fraction n-butanol flavonoïdique (F1) et l'extrait de fraction n-butanol tannique (F2) ont une consistance semi solide. Les observations macroscopiques montrent que la formulation F1 a une couleur allant de marron foncée au marron claire et une odeur sucrée, tandis que la formulation (F2) est d'une couleur brune jaunâtre et d'une odeur douce parfumée (Tableau 19).

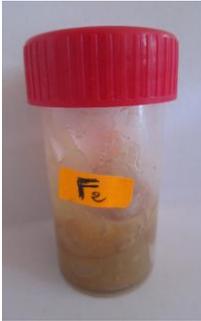
2.7.2 . Homogénéité

Les deux préparations galéniques ont présenté une bonne homogénéité et séparation après la centrifugation sans formation de deux phases dans le tube d'hémolyse. De plus, les mêmes résultats ont été observés après étalement d'une couche mince du chaque formulation sur une surface plane. En effet, la vérification à l'œil nu de ce caractère montre l'absence des agrégats et la bonne répartition des composants (Tableau 19).

2.7.3. Mesure du pH

Le pH de la formulation à base des flavonoïdes est égale à 6.01 ± 0.2 , alors que celui de la formulation à base de tanins est de 5.87 ± 0.09 . Ces valeurs de pH sont voisines à celle de la peau humaine qui est compris entre 4.5 et 6.0 avec une moyenne de 5.5 (Boukhira, 2017). On peut dire que les formulations ne provoquent aucune irritation cutanée sur la peau.

Tableau 19 : Les caractéristiques macroscopiques, organoleptiques et physicochimiques des formes galéniques F1 et F2 préparées à partir des extraits de feuilles et racines d'*A. longa*

Formulation	Odeur	Couleur	Consistance	Homogénéité	
Formulation « F1 »	Odeur sucrée				
		Marron foncé vers marron claire	Semi solide	Homogène	Lisse
Formulation « F2 »	Odeur douce parfumée				
		brune jaunâtre	Semi solide	Homogène	Lisse

2.7.4. Contrôle microbiologique

Le dénombrement des germes aérobies mésophiles viables totaux (DGAT), des moisissures et des levures (DMLT), est effectué à l'aide du compteur de colonies. Les résultats obtenus sont exprimés en unité formant colonie par gramme de l'extrait (UFC/g). Tandis que la recherche de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* est réalisée par un examen visuel des colonies poussant sur les milieux sélectifs, leur présence est confirmé par des tests d'identification.

Les résultats obtenus montrent l'absence des germes viables totaux, des levures, des moisissures et les germes pathogènes (*S. aureus*, et *P. aeruginosa*). Ces résultats répondent aux normes exigées par la pharmacopée européenne (2016), ce qui confirme que les deux formulations sont de bonne qualité microbiologique.

Il est important de noter que la bonne qualité microbiologique des produits testés est justifiée par plusieurs facteurs, à savoir ; l'efficacité de la désinfection du matériel et la zone de préparation, l'absence des impuretés dans les matières premières, le respect des conditions de stockage, le conservateur ajouté et les propriétés protectrices des extraits utilisés. En effet, l'effet inhibiteur des extraits pourrait être due à la présence des flavonoïdes et tanins qui ont présenté une activité antimicrobienne (Smeriglio *et al*, 2016 ; Górnjak *et al*, 2018).

2.7.5. Test de la stabilité

Dans cette étude, le test de la stabilité a été réalisé sur la couleur, l'odeur, l'homogénéité, la consistance, le pH et la charge microbienne pendant 28 jours de conservation à différentes températures de stockage $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. En effet, aucun changement n'est remarqué pendant la période d'essai. Alors que, le suivi de la stabilité du contrôle microbiologique de pommades à différentes températures, a révélé la présence de 10^6 UFC/g de germes aérobies mésophiles pour la formulation F1 et 8×10^5 UFC/g pour la formulation F2 au jour 28 à $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ et l'absence de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, (Tableau 20). Les résultats obtenus sont conformes aux critères d'acceptation de la qualité microbiologique et aux normes recommandées par la pharmacopée européenne (2016) et ils prouvent la bonne qualité microbiologique de nos préparations.

Tableau 20. Résultats de test de stabilité de pommades F1 et F2

Paramètres	Formulation F1									Formulation F2									
	Conditions de stockage																		
	4°C±2°C			25°C±2°C			37°C±2°C			4°C±2°C			25°C±2°C			37°C±2°C			
	Jours			Jours			Jours			Jours			jours			Jours			
	0	14	28	0	14	28	0	14	28	0	14	28	0	14	28	0	14	28	
couleur	Pas de changement de couleur																		
Odeur	Pas de changement de l'odeur																		
Consistance	Semi solide																		
Homogénéité	Homogène lisse																		
pH	6.3±0.1			6.0±0.095			6.2±0.2			5.6±0.7			4.9±0.3			6.01±0.089			
Charge Microbienne (UFC/g)	Bactéries	Pas de croissance			Pas de croissance														
	Moisissures	Pas de croissance			Pas de croissance														
Germes Phathogènes (S.aureus ;P.aerogenosa)		Pas de croissance																	

2.7.6. Test d'irritation cutanée

L'indice d'irritation primaire cutanée présentée dans les tableaux 21 et 22 montrent les scores de Draize visuels pour l'œdème et l'érythème au cours d'une période de 24h et 72h après l'application du produit

Tableau 21. Valeurs numériques de l'évaluation de l'œdème et de l'érythème de la pommade F1 à 5% suivant l'échelle de Draize.

N° de rat	Flanc témoin T				Flanc traité			
	Œdème		érythème		Œdème		érythème	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	1	0	1	0
3	1	0	1	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	1	0	0	0	1	0
6	1	0	0	0	1	0	0	0
Total	2	0	3	0	2	0	2	0

$$IP = [(2+0)+(2+0)]_{\text{flanc scarifié}} + [(3+0)+(3+0)]_{\text{flanc témoin}} / 24$$

$$IP=0.416$$

Tableau 22. Valeurs numériques de l'évaluation de l'œdème et de l'érythème de la pommade F2 à 5% suivant l'échelle de Draize.

N° de rat	Flanc témoin T				Flanc traité			
	Œdème		érythème		Œdème		érythème	
	24h	72h	24h	72h	24h	72h	24h	72h
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0

$$IP = [(0+0)+(0+0)]_{\text{flanc scarifié}} + [(0+0)+(0+0)]_{\text{flanc témoin}} / 24$$

$$IP=0$$

Une formation de l'œdème et l'érythème a été observée chez 04 sujets traités par les deux pommades durant les 24heurs .Tandis que, ces phénomènes ont été disparus après 72heurs. Par ailleurs, l'apparition de l'œdème et l'érythème peut être due à la sensibilité de la peau de quatre rats aux substances présentées dans les plantes médicinales .En revanche, la peau peut être également sensible aux stimuli extérieurs comme la scarification qui atteint parfois le derme et provoque la libération des médiateurs pro-inflammatoires (Elkassouani, 2013)

D'après les résultats mentionnés dans les deux tableaux précédents, l'indice d'irritation primaire cutanée de la pommade à base de flavonoïdes "F1 " est égal à 0.416, alors que l'indice d'irritation primaire cutanée de la pommade à base de tanins "F2" est égal à 0. Donc selon l'échelle numérique de Draize, nos pommades sont considérées comme des produits non irritants pour la peau ($IP < 0.5$)

2.8. Evaluation de l'effet anti-inflammatoire des formulations galéniques sur le modèle d'arthrite rhumatoïde

2.8.1. Evaluation de paramètres cliniques

2.8.1.1. Evolution du poids corporel des rats

Le suivi de l'évolution du poids corporel des rats témoins sains, induits non traités, traités par la vaseline (placébo) et traités par les formulations galéniques et diclofénac pendant l'expérimentation sont représentés dans la figure 30

Une réduction du poids corporel était observée chez tous les rats après l'induction de l'arthrite avec une diminution significative par rapport au groupe témoin ($P < 0.001$), alors que le gain de poids corporel a été observée chez les rats traités par le gel de diclofénac sodique et les formulations F1 et F2 avec une différence significative par rapport aux rats témoins ($P < 0.01$) L'augmentation du poids corporels chez les rats traité traduit l'efficacité du traitement utilisé et l'effet antiinflammatoire.

Une légère augmentation du poids corporel a été remarquée chez le groupe induit non traité en comparant avec le groupe témoin. En effet, les rats ont difficilement atteints la nourriture.

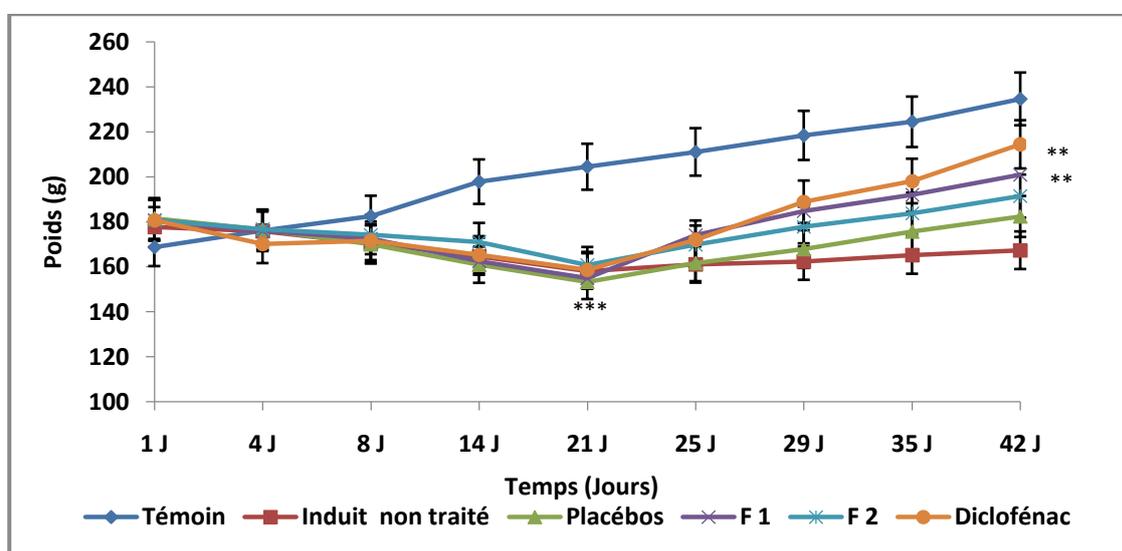


Figure 30: Evolution du poids corporel des rats pendant la période d'expérimentation. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, par rapport au groupe témoin (Test d'ANOVA)

Le changement du poids corporel chez les animaux induits par le CFA utilisé comme un facteur essentiel pour évaluer l'évolution de la maladie et la réponse au traitement par des médicaments anti-inflammatoires (Bansod *et al*, 2011).

D'ailleurs, le poids corporel, la prise alimentaire et le métabolisme sont affectés par l'immunité et l'inflammation et ils sont régulés par une hormone de type cytokinique (Mondal *et al*, 2016)

2.8.1.2. Evolution de l'œdème

La comparaison de l'évolution de l'œdème été faite entre les groupes subissaient différents traitements et le groupe des rats induits par le CFA non traités.les résultats sont présentés dans la figure 31.

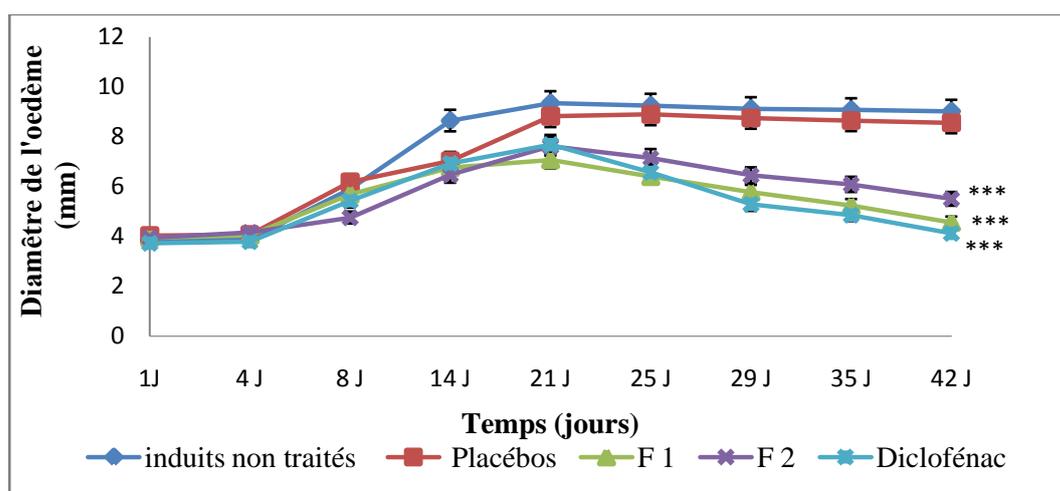


Figure 31: Evolution de l'œdème des rats induits non traités et traités pendant l'expérimentation. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001 par rapport au groupe des rats induits non traités (Test d'ANOVA)

L'induction par CFA dans la partie sub- plantaire de la patte postérieure gauche des rats provoque le gonflement et le développement d'un œdème. L'apparition de l'œdème est due à l'augmentation de la perméabilité vasculaire sous l'influence des médiateurs de l'inflammation telle que l'histamine, les prostaglandines, l'accumulation des protéines plasmatiques (fibrinogène) et les immunoglobulines (Kumar *et al*, 2006).

Les résultats obtenus montrent une augmentation remarquable de diamètre de l'œdème de la patte postérieure des rats en fonction du temps, il aboutit une valeur maximale de 8,65mm chez les rats de groupe induits non traités. En outre, des gonflements des tissus mous autour de la cheville des articulations sont apparues au cours de la progression de l'arthrite chez les rats injectés par FCA, qui sont considéré comme un œdème de les tissus exigeants (Rajarm *et al* ,2015).

L'application topique de traitements de pommades F1, F2 et diclofénac a réduit significativement le diamètre de l'œdème par rapport au groupe induits non traités à l'exception du groupe traité par la vaseline (placébo) qui est non significative au groupe induits non traités, On outre une différence significative de la réduction de diamètre de l'œdème a été observée ($P < 0.001$).

Le traitement par la formulation F1 a réduit l'évolution de l'œdème par une différence de 4,57 mm et un pourcentage d'inhibition de 88,28%, tandis que une différence de 5,51 mm qui correspondant à 70,51% été enregistrée par le traitement de pommade F2 (Figure 32). L'effet inhibiteur donné par la formulation F1 est proche à celui du traitement par diclofénac qui enregistre un pourcentage d'inhibition de 91,99% avec une différence de 4,13 mm au 42^{ème} jour (Figure 32). Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Soni et ses collaborateurs (2013).

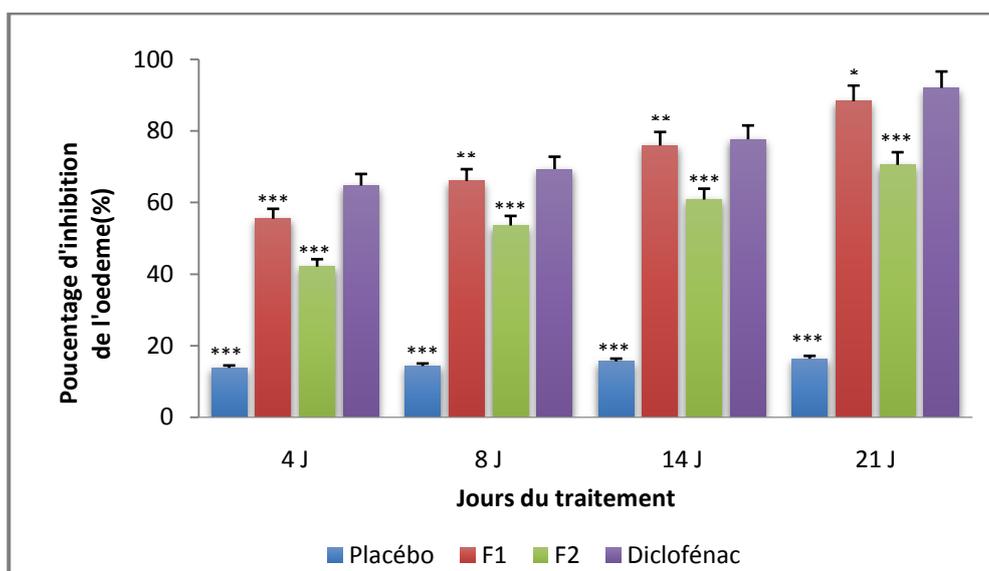


Figure 32 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème pendant le traitement. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ par rapport au groupe traité par diclofénac (Test d'ANOVA)

Le pouvoir d'inhibition de l'œdème inflammatoire du l'adjuvant complet de Freund chez les rats peut être lié à l'inhibition des cyclo-oxygénases et lipooxygénases dans la phase tardive de l'œdème (Sene *et al.*, 2016)

Nous pouvons conclure que la capacité de réduire l'œdème par les formulations F1 et F2 est due principalement à la présence des substances bioactives de quantités différentes caractérisées par leurs effets anti-inflammatoires.

Des travaux antérieurs prouvent que les flavonoïdes et tanins ont un effet anti-inflammatoire important. Effectivement, le kaempférol et l'apigénine inhibent l'activation des cytokines proinflammatoires et diminuent la réponse de cellules Th1 et Th17 (Min-Hsiung *et al.*, 2010), tandis que, les tanins agissent sur les enzymes responsables à la régulation de l'expression de la COX-2 (Yuee Cai, 2016). En effet la présence de flavonoïdes et tanins dans les fractions n-butanol flavonoidique et tannique d'*A. longa* confirment nos résultats.

D'ailleurs, plusieurs études sur l'activité anti-inflammatoire des espèces de la famille *Aristolochiaceae* ont été réalisées, néanmoins, aucune évaluation inflammatoire *in vivo*, de la plante *A. longa* n'a été réalisée, à l'exception l'étude *in vitro* mené par Merouani et ses collaborateurs (2017), qui montrent que l'extrait acétonique de la partie aérienne possède une activité anti-inflammatoire importante.

2.8.1.3. Indice arthritique

L'intérêt de l'indice arthritique réside dans la définition d'un profil de malade. Il peut donc permettre un diagnostic pour la PR établies et une classification des malades par profil (Boutet, 2016). La détermination de l'indice arthritique est essentiel dans l'évaluation et le suivie de l'intensité, la gravité de la PR et l'efficacité du traitement appliqué (Choudhary *et al.*, 2014 ; Srinivasa *et al.*, 2019).

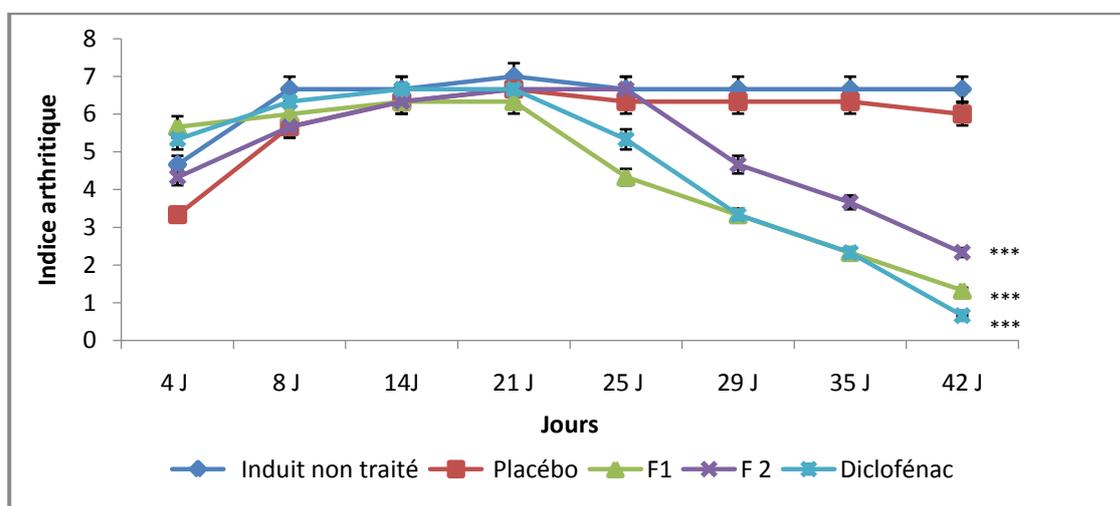


Figure 33 : Effets des traitements (vaseline, F1, F2 et diclofénac) sur le score arthritique dans le modèle d'adjuvant complet de Freund. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: $p < 0.001$, par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)

Les résultats présentés dans la figure 33 montrent que tous les rats recevant l'adjuvant complet de Freund subissent une augmentation du score arthritique dans une ou plusieurs pattes postérieures et antérieures.

Ainsi, le niveau maximal du score arthritique est observé au jour 21. Cependant les rats des groupes traités par F1, F2 et diclofénac ont montré une diminution significative ($P < 0.001$) et dose-dépendante du score arthritique à partir du jour 25 jusqu'à la fin de l'expérimentation par rapport au groupe induit non traité.

Bien que les deux traitements (F1 et F2) aient montré une diminution significative du score arthritique, le meilleur effet est donné par la pommade F1 en comparaison avec le traitement du standard.

L'indice arthritique est l'un des paramètres de l'évaluation clinique de l'inflammation chronique de l'arthrite rhumatoïde. Les articulations des pattes adjuvantes ont présenté un gonflement et une rigidité remarquable (Choulhary *et al*, 2014). Les mêmes résultats ont été observés par Sid Larbi *et al* (2017).

Le développement de lésions secondaires de patte après l'injection d'adjuvant est une indication de l'immunité à médiation cellulaire. (Van Eden *et al.*, 1985). La réduction des lésions arthritique secondaire suggère l'effet immunomodulateur et démontre son efficacité dans la suppression de l'immunité cellulaire (Reddy Jitta *et al*, 2019).

2.8.2. Evaluation de paramètres biologiques

2.8.2.1 Poids relatif des organes

Le poids relatif des organes renseigne sur l'évolution de l'organe par rapport à celui de l'organisme. Après la fin du traitement, tous les rats ont été sacrifiés et les organes (poumons foie, cœur et reins) ont été analysés et pesés. Les valeurs du poids relatif des organes prélevées des groupes des rats sont présentées dans la figure 34.

Pour les groupes induits non traités et induits traités par la vaseline (placébo), on remarque une augmentation significative ($P < 0.01$) des poids relatifs de foie et des reins par rapport au groupe témoin. En effet, l'augmentation du poids relatif de foie est due au phénomène d'hypertrophie et les manifestations hépatiques qui accompagnent les maladies rhumatologiques (Falgarone *et al*, 2013).

A l'exception d'une légère augmentation significative ($P < 0.05$) du poids relatif des reins des rats traités par la formulation F2, toutes les autres valeurs du poids relatif des organes des rats des groupes traités par F1 et diclofénac sont proches à celles obtenus chez les rats témoins, ce qui explique l'efficacité du traitement et l'effet antiinflammatoire de formulations galéniques préparées. Ces résultats confirment les résultats obtenus précédemment sur la diminution de l'œdème de la patte de rats après l'application du traitement.

Il faut signaler que des organes internes comme les reins et le foie sont les premiers organes affectés par la réaction métabolique provoqué par une substance toxique (Raza *et al*, 2002).

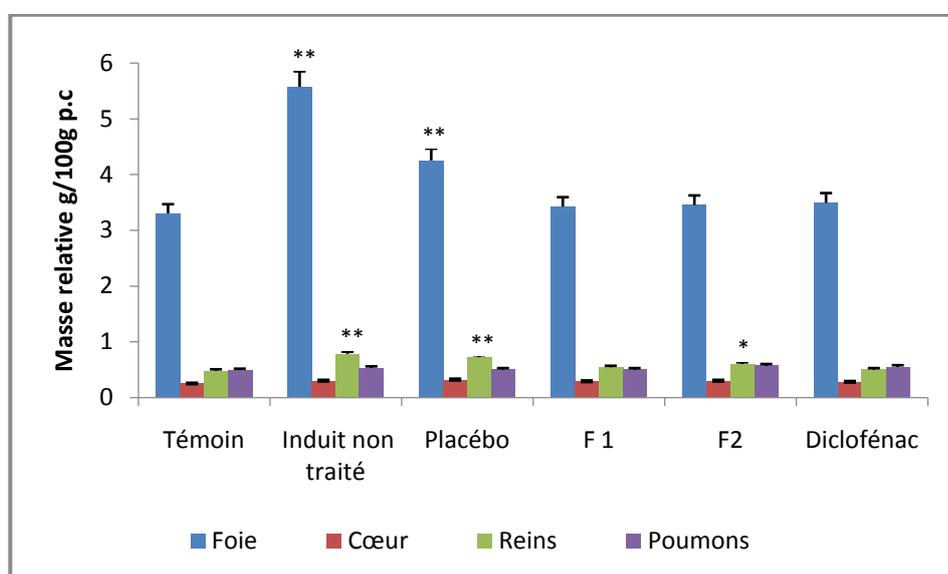


Figure 34 : Poids relatif des organes des rats témoins sains, induits non traités et traités par vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) **: p < 0. 01, *: p < 0.05 par rapport au groupe témoins. (Test d'ANOVA)

2.8.2.2. Indices de la rate et du thymus

Après 42 jours du traitement, le poids de la rate et du thymus est enregistré. L'indice de la rate et du thymus est calculé par la division du poids pesé sur le poids corporel du rat .Les valeurs des indices sont illustrées dans la figure 35.

Une augmentation significative ($P \leq 0,05$) des indices de thymus et de la rate est observé après l'induction de l'Adjuvant complet de Freund .A l'exception du groupe traité par la vaseline, tout les groupes subissent différents traitements enregistrent une réduction significative ($P < 0,05$) des indices de la rate et du thymus par rapport aux celles de groupe induit non traité.

Pour les indices de la rate, une augmentation significative ($P < 0.01$) est observé chez les rats induits non traités , traités par la vaseline et traités par F2,tandis que ,aucune différence significative n'est constaté chez les rats traités par la pommade F1 et le gel diclofénac par rapport au groupe témoin.

Aucune différence significative n'est observée entre le groupes témoin et les groupes traités par la pommade F1 et le gel diclofénac, par contre, une augmentation hautement significative ($P < 0.01$) des valeurs de l'indice du thymus de groupes induit non traité, traité par la vaseline et traité par la pommade F2 par rapport au groupe des rats témoins.

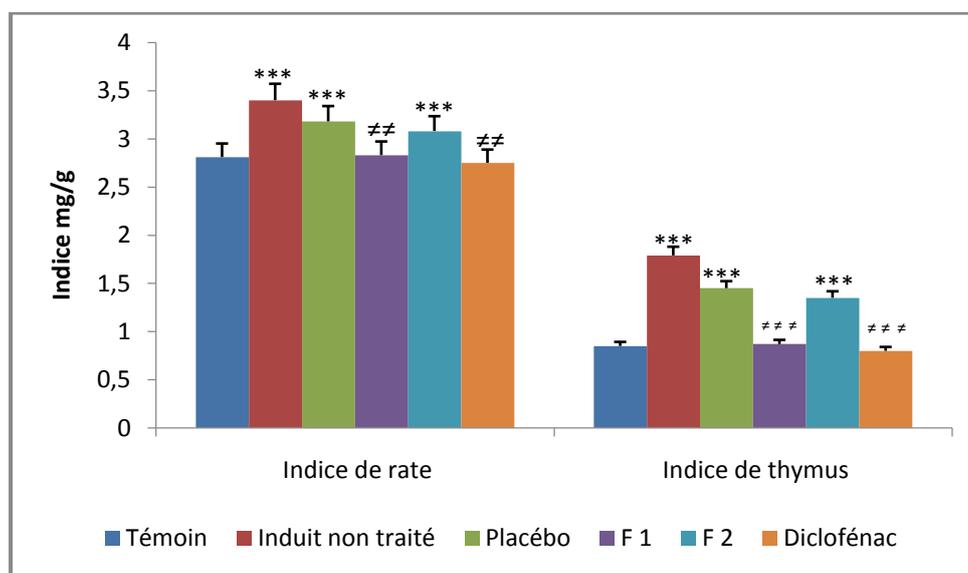


Figure 35 : Indices de la rate et du thymus de rats témoins, rats induits non traités et des rats traités par vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM ($n = 6$) ***: $p < 0.001$, différence significative par rapport au groupe témoin. # # : $p < 0.001$, # # # : $p < 0.01$, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)

D'après les résultats obtenus on peut conclure que les pommades F1 et F2 sont un traitement antiinflammatoire efficace en comparaison avec le traitement par le gel diclofénac .Ainsi, les observations de la réduction des indices de la rate et thymus sont en concordance avec celles de Aiyalu *et al*(2016), alors que Choudhary et ses collaborateurs (2014), ont conclu que l'induction par Adjuvant complet de Freund provoque la diminution du poids du thymus.

D'une façon générale, l'augmentation du poids des organes lymphoïdes (thymus et rate) est probablement due à l'hyperplasie des cellules immunitaire et l'amplification de la réponse immunitaire humorale et cellulaire après l'induction par l'adjuvant complet de Freund (Hernández *et al*,2013).

2.8.3. Evaluation des paramètres biochimiques

Au cours de cette expérimentation nous avons suivi quelques paramètres biochimiques comme: la protéine réactive C(CRP), le facteur rhumatoïde (FR), la phosphatase alcaline (PAL),l'aspartate aminotransférase (ASAT),l'alanine aminotransférase (ALAT).Les prélèvements ont été effectués au 21^{ème} jours de l'induction et à la fin du traitement. Il nous a permis de suivre l'effet du produit immunisé et évaluer bien sûr l'effet de nos pommades sur les paramètres cités au- dessus.

2.8.3.1. Protéine Réactive C (CRP)

La détermination de taux de CRP est devenue important pour évaluer une inflammation chronique. Les valeurs de la CRP de différents groupes de l'expérimentation sont illustrées dans la figue 36 .Une augmentation hautement significative ($P<0.001$) du taux de CRP dans le sérum est remarqué chez le groupe induit non traité par rapport au groupe témoin (63.2 mg/ml et 5.92 mg/ml respectivement), Pour le reste des groupes induits et traités, une augmentation significative ($P<0.01$) notamment est observé après 21 jours de l'induction par rapport au groupe témoin. L'effet du traitement par F1, F2 et diclofénac était traduit par la diminution hautement significative ($P<0.001$) de taux de CRP par rapport au groupe induit non traité. De plus, aucune différence significative n'est observée chez les groupes traités par F1(6.03 mg/ml) et diclofénac (6.93 mg/ml) après le traitement. En effet, ces valeurs de la CRP sont proches à celle du groupe témoin.

Les résultats de l'étude de Sid Larbi *et al* (2017) ont aussi prouvé l'effet des extraits méthanoliques de l'*Inula iscosa* L et l'*Anacylus valentinus* L sur la régulation du taux sérique de la CRP chez les rats atteints d'une arthrite rhumatoïde. Cet effet a été interprété par la suppression de l'inflammation et l'inhibition de la synthèse des médiateurs chimiques. Ainsi, l'augmentation de niveaux de la CRP est démontré dans un autre modèle expérimental de l'arthrose suite a l'injection intra-articulaire de mono-iodo acétate(MIA), ceci montrant aussi, l'effet réducteur des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* et *Populus alda* sur la stabilité de valeurs sérique de la CRP (Belkhodja *et al* ,2016).

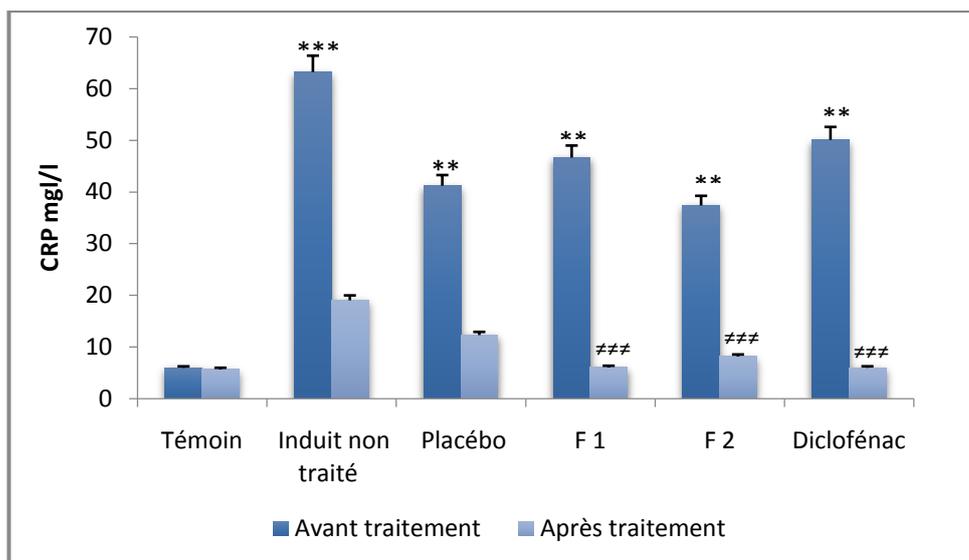


Figure 36 : Valeurs de la CRP chez les rats témoins, induits non traités, traités par la vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, différence significative par rapport au groupe témoins. ###: $p < 0.001$, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)

Bien que la CRP soit un marqueur d'une inflammation tel que la poly arthrite rhumatoïde, elle joue un rôle dans la régulation des processus inflammatoires. Ainsi, plusieurs études ont démontré la présence d'une relation entre la CRP et les cytokines pro-inflammatoire sécrétés par divers cellules du système immunitaire. On outre, L'interleukine – 6(IL-6) semble le principal inducteur de l'expression du gène CRP (Sproston et Ashworth, 2018). La signalisation de l'IL6 peut être renforcée par l'interleukine IL-1F et le TNF qui augment tout les deux la transcription de la CRP (Salazar *et al*, 2014).

D'ailleurs, la CRP présente un niveau élevé lors des affections inflammatoires dans le sérum. Cependant lorsque les stimuli se terminent, les valeurs diminuent de façon exponentielle sur 18 à 20heurs. (Sproston et Ashworth, 2018)

Il est démontré que les taux sériques élevés de protéine réactive C étaient en corrélation avec le patient atteint de polyarthrite, la progression radiologique et la réponse au traitement (Robert, 2000). En effet, la CRP est largement produite dans les tissus synoviaux. Les synoviocytes de type fibroblaste sont les cellules majeurs responsables de la production de CRP en présence des récepteurs le CD32 et CD64 (Marnell *et al*, 2005)

2.8.3.2. Facteur rhumatoïde (FR)

Les valeurs du facteur rhumatoïde de différents groupes des rats témoins, induits non traités et traités sont présentées dans la figure 37. Les résultats montrent l'augmentation significative ($P < 0.001$) de toutes les valeurs du FR des rats immunisés par CFA par rapport au groupe témoin (8 UI/ml). Par ailleurs, le groupe induit a montré une valeur élevée (60.18 UI/ml) après 21 jours de l'induction.

L'application cutanée de pommades, F1, F2 et diclofénac provoque une diminution significative des valeurs du FR (10,66, 15,66 et 8 UI/ml respectivement) par rapport au groupe induit non traité ($P < 0.001$). Par contre le traitement par la vaseline ne provoque aucun effet sur les valeurs du FR par rapport au groupe induit non traité (45 UI/ml).

Donc, nos pommades ont un effet sur la régulation du taux du FR, en tenant compte aussi la propriété anti-inflammatoire et l'efficacité du gel diclofénac dans la régulation et la réduction de valeurs du FR.

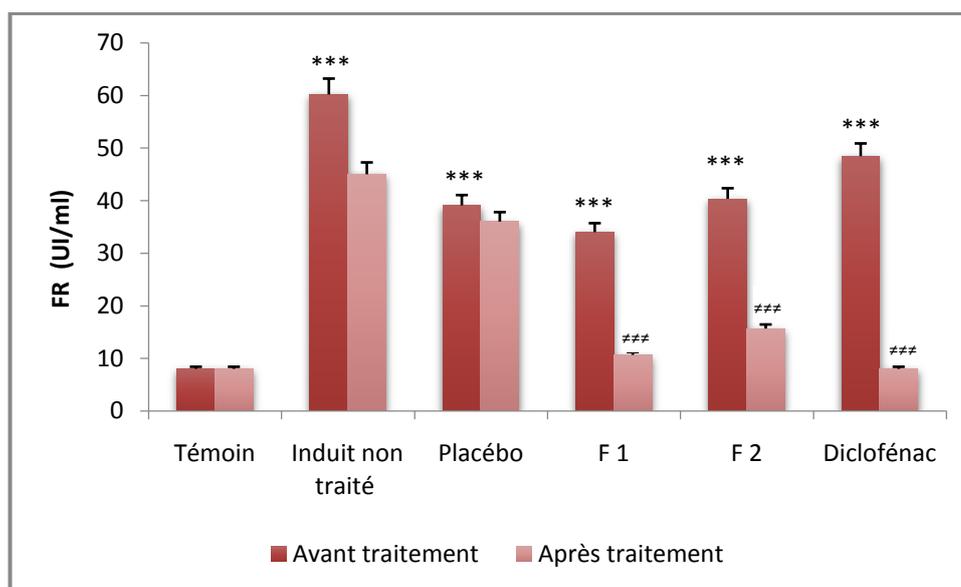


Figure 37 : Valeurs du facteur rhumatoïde chez les rats témoins, induits non traités, traités par la vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: $p < 0.001$, différence significative par rapport au groupe témoin. ###: $p < 0.001$, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)

Bien que, la présence d'un taux significatif de FR dès le début de la polyarthrite rhumatoïde, il est ni indispensable ni suffisant pour affirmer le diagnostic. En effet, on trouve du FR dans de nombreuses pathologies (Culioli, 2016).

Dans le cas de polyarthrite rhumatoïde, le FR est synthétisé au niveau de la synovie par les plasmocytes, en plus, il joue un rôle important dans la sécrétion des cytokines pro inflammatoires (Gerhard ,2002) .Il est également indiqué dans le développement de certaines complications extracellulaires, en particulier dans les vascularites rhumatoïdes (Bartels et Bridges ,2010)

2.8.3.3. Calcémie

Malgré la présence du calcium en petites quantités ,il est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques tel que la contraction vasculaire, la transmission nerveuse et la sécrétion hormonale (Beto,2015) .C'est un réservoir important déposé dans la matrice organique du squelette .En plus , l'équilibre global du calcium est maintenu au niveau du squelette par actions opposés des cellules osseuses(Ross *et al*,2011).La libération rapide de minéraux de l'os est essentielle pour maintenir des niveaux adéquats de calcium ionisé dans le sérum (Ross *et al*, 2011)

L'érosion et la destruction articulaire constituent l'étape terminale du mécanisme physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde (Culioli, 2016). On outre, une augmentation du calcium sous forme ionisé dans le sérum peut être causée par plusieurs mécanismes pathologiques. En effet, l'hypercalcémie est liée à l'augmentation de la production de parathormone, une intoxication par la vitamine D, une hyperparathyroïdie primaire et tertiaire et des métastases osseuses (Schenck *et al*, 2006 ; Kingsley *et al*, 2017)

D'après nos résultats, les valeurs sériques du calcium sont présentées dans la figure 38. Les valeurs plasmatiques du calcium sont maintenues stables au cours de l'expérimentation, pour le groupe témoin et le groupe des rats induits non traités, alors que les valeurs du groupe traité par la vaseline, sont proches à celles des rats induits non traités avant et après le traitement (figure 38).

Par ailleurs, une augmentation significative est enregistrée chez tous les groupes après l'induction par le CFA par rapport au groupe témoin($P<0.001$). En revanche, une diminution significative a été remarquée chez les groupes traités par F1, F2 et diclofénac par rapport au groupe induit non traité($P<0.001$).

Une étude menée par Srinivasa *et al*, (2019) a prouvé que l'induction par CFA provoque l'augmentation des niveaux du calcium et que les extraits de la plante *Terminalia tomoentosa* inhibent l'augmentation des niveaux du calcium.

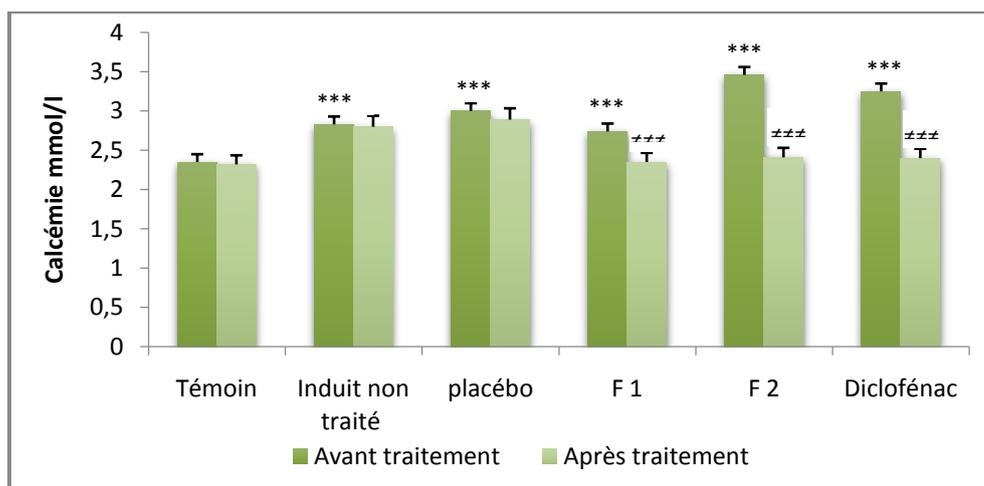


Figure 38 : Valeurs de la calcémie chez les rats témoins, induits non traités, traités par la vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: $p < 0.001$, différence significative par rapport au groupe témoin. ###: $p < 0.001$, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)

Il a été démontré que les isoflavones peuvent préserver la résorption osseuse au l'altération des médiateurs inflammatoires, l'amélioration de l'ostéoclastogenèse, l'activation des protéines tyrosine phosphatase et par l'induction de l'apoptose (Nicolin *et al.*, 2019)

2.8.3.4. Phosphatase alcaline sérique (PAL)

L'ensemble des résultats de valeurs de PAL des rats des groupes témoin, induit non traité, traité par la vaseline, pommade F1, F2 et diclofénac sont démontrés dans la figure (39).

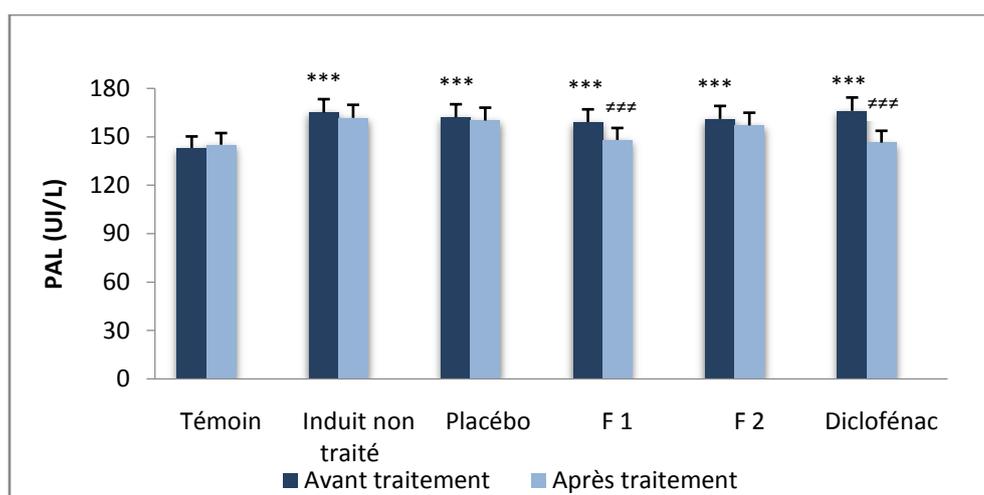


Figure 39 : Valeurs de PAL chez les rats témoins, induits non traités, traités par la vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: $p < 0.001$, différence significative par rapport au groupe témoins. ###: $p < 0.001$, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)

Pour les groupes des rats induits non traités et traités par la vaseline, aucun changement significatif dans les valeurs de la phosphatase alcaline du sérum avant et après le traitement n'a été observé (tout de long de période d'expérimentation). Cependant nous avons enregistré une diminution significative ($P < 0.001$) après le traitement chez les rats traités par la pommade F1 ($148 \pm 0.50 \text{ UI/L}$) et diclofénac ($147.34 \pm 0.036 \text{ UI/L}$) par rapport aux groupe (induits non traités) témoins ($145,1 \pm 0.065 \text{ UI/L}$). Aucune différence significative ($P > 0.05$) des valeurs est enregistré chez les rats traités par F1 et diclofénac. Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenu par Belkhodja *et al* (2016).

Les phosphatases alcalines sont des enzymes présentés pratiquement dans tout l'organisme en particulier dans le foie et les os. L'élévation du taux des phosphatases alcalines est due aux maladies métastases osseuses, hyperparathyroïdie, les maladies hépatobiliaires. Ils sont présents dans le liquide synovial ainsi que dans le sérum. En effet, une corrélation positive a été démontrée entre les PAL sériques et la polyarthrite rhumatoïde dans l'étude de Nanke *et al* (2002).

Shen *et al.*, (2009) ont rapporté que la l'épigallocatechin a un effet sur l'ostéoporose par le biais de l'amélioration de l'activité phosphatase alcaline dans les cellules ostéoclastes .

2.8.3.5. Transaminases (ALAT, ASAT)

Les transaminases permettent le transfert du groupement aminé d'un acide aminé sur au acide acétonique ou l'inverse. Les transaminases sont des enzymes appartiennent aux métabolismes cellulaire libérées dans le sérum par un organe ou un issu lésé (Valdiguié, 2002).

On outre, ce sont des marqueurs de lésion hépatocellulaire et la présence des dommages au foie. Leurs niveaux nous permettent d'évaluer le degré d'anomalie. Ainsi leur présence dans le sérum indique une lésion hépatocellulaire (Limdi et Hyde, 2003) .D'ailleurs, ces enzymes libérées par les hépatocytes lorsqu'ils sont endommagés (Friedman et Keeffe ,2004).En effet, l'augmentation de taux sériques des transaminases traduit la présence des variations pathologiques tell que les affections cardiaques et hépatiques.

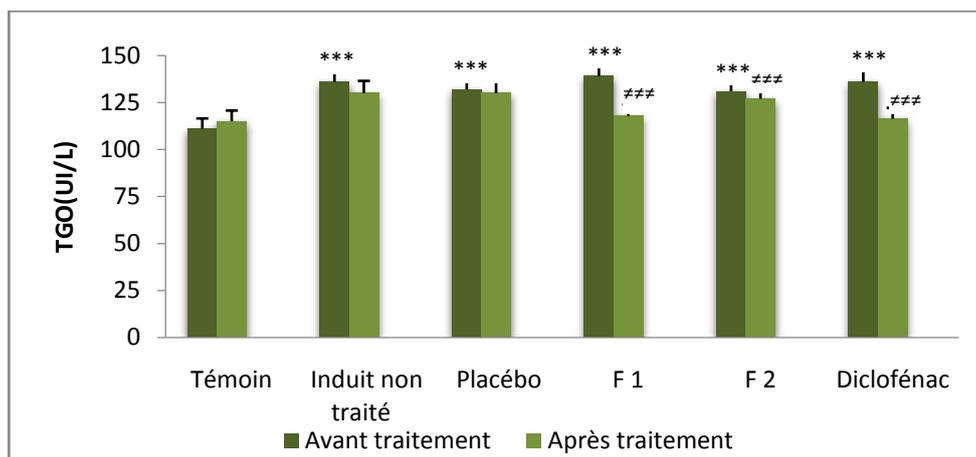


Figure 40 : Evolution des enzymes hépatique Aspartate aminotransferase (ASAT-TGO) avant et après le traitement par vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, différence significative par rapport au groupe témoins. $^{###}$: p < 0.001, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)

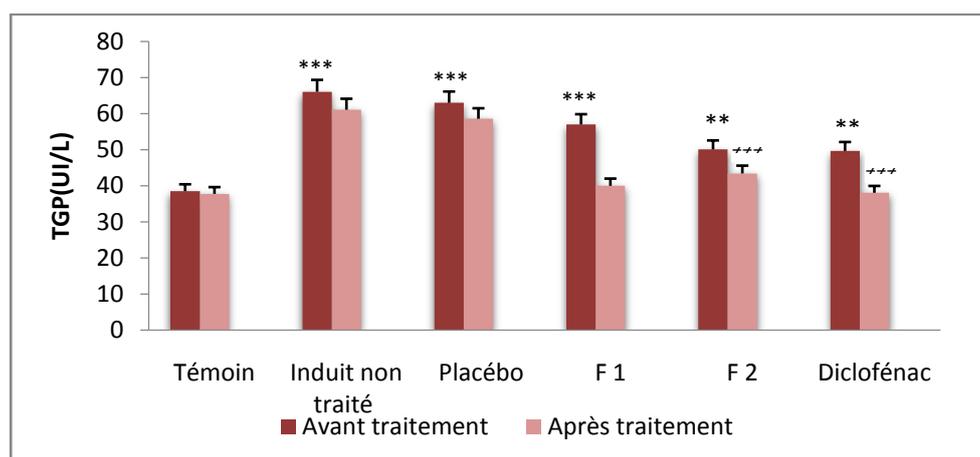


Figure 41 : Evolution des enzymes hépatique Alanine aminotransférase (ALAT-TGP) avant et après traitement par vaseline, F1, F2 et diclofénac. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM (n = 6) ***: p < 0.001, **: p < 0. 01, différence significative par rapport au groupe témoins. $^{###}$: p < 0.001, différence significative par rapport au groupe induit non traité (Test d'ANOVA)

Nous avons observé une augmentation significative de l'activité ASAT et ALAT chez les rats induits non traités (140.3UI/L et 66.06 UI/L respectivement) par rapport aux témoins suite à l'induction de CFA. L'application du traitement par F1, F2 et diclofénac a diminué de manière significative l'activité de ces enzymes (P<0.001) par rapport au groupe des rats induits non traités. Aucune différence significative est obtenus chez les rats de groupe témoin et rats traités par diclofénac (p>0.05).

Les résultats de l'étude réalisé par Gounoue *et al.*,(2019) a montré que l'extrait de la plante *Tapinanthus* peuvent réduire l'activité de l'ASAT et l'ALAT élevées dans le modèle poly arthrite induit par adjuvant complet de Freund.

L'augmentation significative de l'activité de l'ALAT et l'ASAT peut être expliqué par l'effet détruit du CFA sur les cellules hépatiques, la présence de nécrose des cellules rénales et une altération de la filtration glomérulaire (Gounoue *et al.*, 2019). Ainsi, Il a été rapporté que l'administration par l'adjuvant complet de Freund chez les rats altère immunologiquement la biochimie hépatique (Nandhagopal et Kanniyakumari, 2016).De plus, l'élévation de taux de l'ALAT et ASAT est due à l'insuffisance hépatique et rénale causée par l'injection de l'adjuvant complet de Freund (Li *et al.*, 2018).

A la lumière des résultats des analyses de quelques paramètres biochimique et d'évaluer l'effet thérapeutique, nous pouvons conclure qu'une meilleure activité antiinflammatoire contre l'arthrite rhumatoïde a été observé avec la pommade F1 à base d'extrait n-butanol flavonoidique des feuilles d'*A.longa* .Contrairement à la pommade F2 préparée à partir de l'extrait n-butanol tannique des racines d'*A.longa* ,leur effet est moyennement efficace. Cette différence peut être due aux teneurs en flavonoïdes présentées dans les feuilles et tanins présentées dans les racines .En effet, les résultats d'analyses qualitatives effectuées par l'HPLC confirment nos hypothèses.

2.8.4. Analyse Radiographique

Dans notre étude, il était nécessaire de faire des examens radiologiques afin de comprendre l'effet thérapeutique de formulations galéniques préparées. En effet, cette étape est complémentaire, afin d'apprécier l'évolution de la maladie et l'efficacité du traitement appliqué.

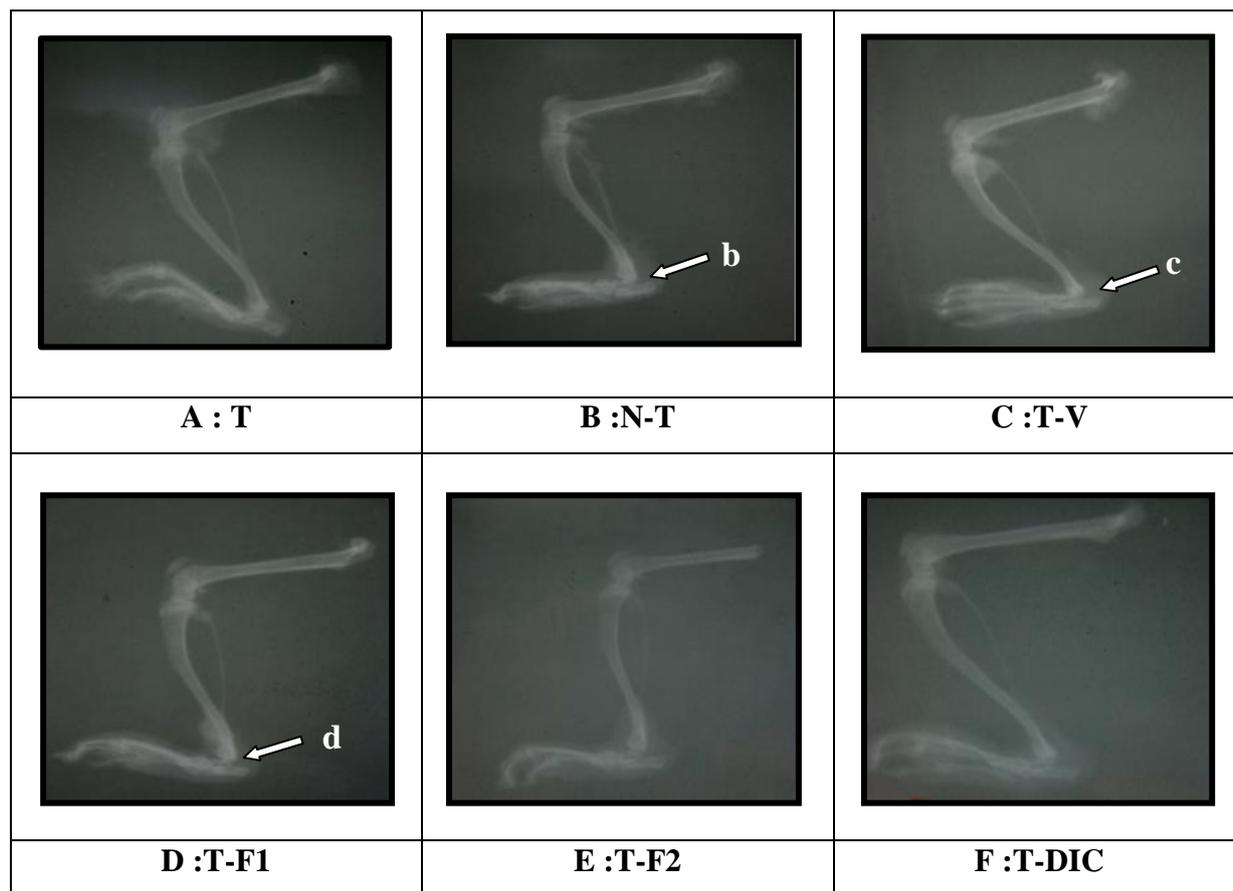


Figure 42. Images radiologiques de pattes des rats après l'induction de CFA et après le traitement. **T**: témoin sain ; **N-T** : induit non traité ; **T-V** : traité par vaseline ; **T-P1**: traité par pommade F1 ; **T-P2** : traité par pommade F2; **T-DIC**: traité par diclofénac. **b** et **c** : épaissement des parties molles et pincement de l'interligne articulaire. **d** : une tuméfaction synoviale réduite et léger pincement de l'interligne articulaire.

Les images radiologiques de l'articulation de la cheville des rats sains (figure 42,A) montre une *fémoro-tibiale* avec aspect radiographique normal et d'opacité normale, aspect bicondylien normal.

La radiologie de l'articulation des rats injectés par adjuvant complet de Freund non traités et traité par vaseline (N-T ;T-V) permet de révéler la présence d'une SYNOVITE, un épaissement des parties molles avec tuméfaction synoviale majeure très apparent au niveau de la région articulaire Tibio-tarsienne(figure 42,B et C). Le pincement de l'interligne articulaire précoce et déminéralisation épiphysaire tibial distale, signifie une destruction osseuse,

Les images radiologiques des rats traités par les formulations F1 et F2 montrent une articulation *fémoro-tibiale* aspect radiographique normale et d'opacité normale, épaissement des parties molles avec tuméfaction synoviale fortement réduite surtout chez les rats de groupe traité par la formulation F1, léger pincement de l'interligne articulaire et absence de proliférations osseuses (Figure 42., D et E)

L'examen radiologique des articulations des rats traités par diclofénac est généralement caractérisé par une *Articulation fémoro-tibiale* avec aspect radiographique normal, d'opacité normale et aspect bicondylien normal, un léger épaissement des parties molles. Un léger pincement de l'interligne est également apparaisse avec tuméfaction synoviale fortement réduit en région articulaire avec absence de déminéralisation épiphysaire tibial distale (figure 42, F). De plus, l'examen met en évidence d'une nette résolution en comparaison avec les sujets non traités et ceux traités par la vaseline et les deux formulations galéniques (F1 et F2) (figure 42, F).

En effet, Chez les rats arthritiques induits par adjuvant complet de Freund, un gonflement de plusieurs articulations, influence des cellules inflammatoire, érosion du cartilage articulaire et une désorption osseuse aboutissent finalement à la destruction complète de la stabilité et de la mobilité articulaire (Rajarm *et al.*, 2015)

2.8.5. Analyse histologique

Une biopsie de l'articulation de la cheville a été réalisée dans le but d'un diagnostic approfondie de la maladie, cette analyse histologique permet de mettre en évidence l'état de l'articulation avant et après le traitement des rats testés. Les changements histopathologiques dans les différents groupes sont illustrés dans la figure 43.

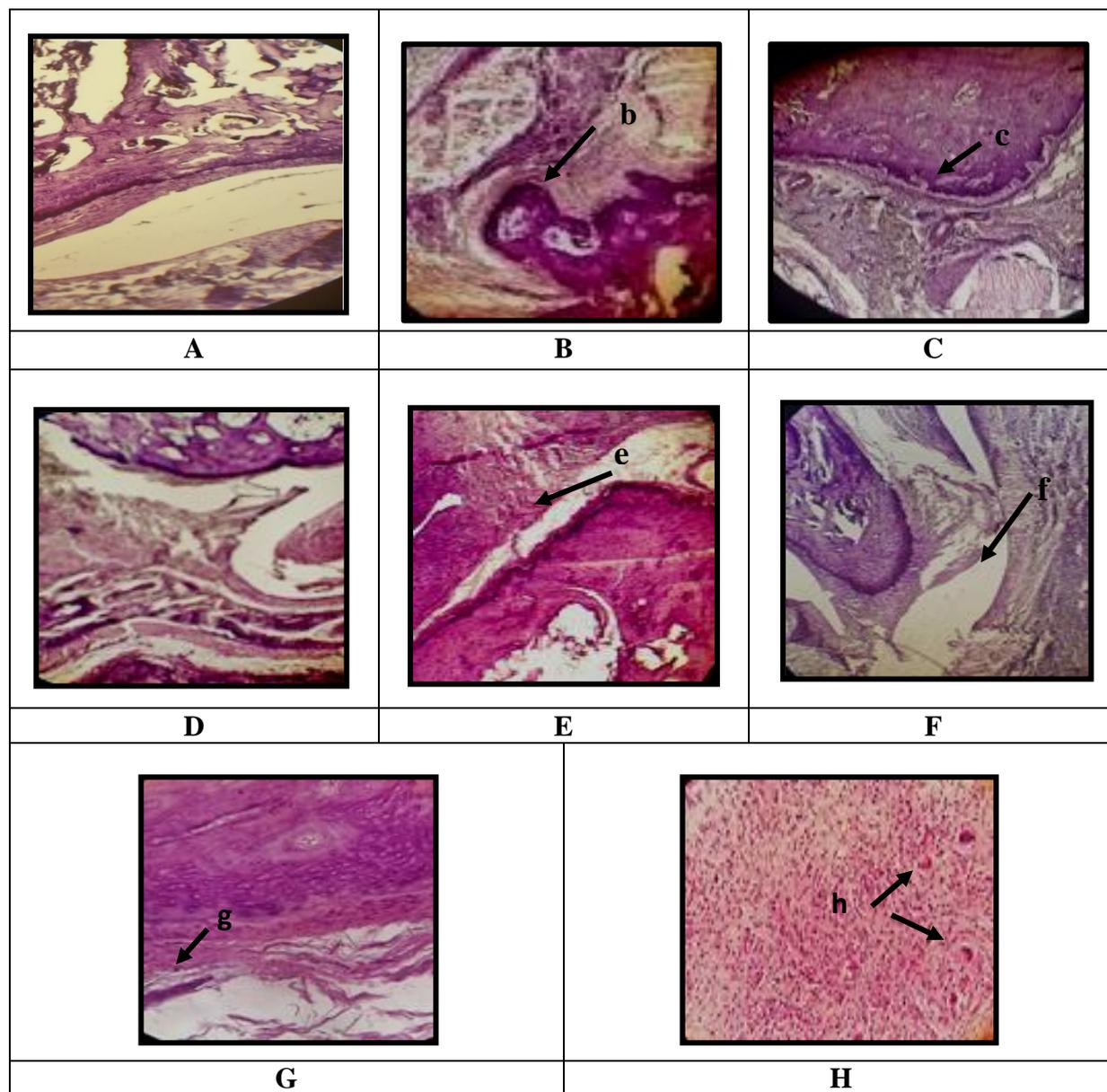


Figure 43 : Images des coupes histologiques de l'articulation de la cheville. **A:**Témoïn sain ;**B:** non traité ("b ":hyperplasie de la membrane synoviale « synovite ») ; **C:**traité par vaseline;("c ":formation d'un pannus) X40 ;**D:** traité par formulation F1 ; **E:**traité par formulation F2("e" :Formation d'une fibrose inflammatoire) ; **F :** traité par diclofénac X40 ("f" :cavité articulaire normale) ;**G:** Fibrillation de la couche superficielle du cartilage articulaire X100 ; **H:**Inflammation granulomateuse X100.

L'analyse histopatologique des rats du groupe témoin a révélé une morphologie histologique normale du cartilage de l'articulation et des cellules chondrocytes normales.

On outre ,les résultats histologiques des rats induits par CFA non traités (B) et traités par vaseline (C) montrent des changements morphologiques y compris une inflammation granulomateuse , une synovite , hyperplasie de la membrane synoviale ,érosion du cartilage articulaire ,fibrillation de la couche superficielle du cartilage articulaire, lésion osseuse, installation d'un tissu fibreux dense entre la membrane synoviale et l'os (Fibrose) responsable d'une ankylose de l'articulation et formation d'un pannus(Figure43,B et C) .

En ce qui concerne le groupe traité par la formulation "F1", l'histologie de l'articulation était caractérisé par la présence d'un vide synoviale plus ou moins préservé , reconstruction et prolifération du cartilage articulaire (Figure 43,D).Alors que ,les observations microscopiques des coupes histologiques des rats traités par la formulation "F2"ont montré une inflammation granulomateuse, formation d'une Fibrose et une prolifération du cartilage dans certaines zones (Figure 43,E).

L'analyse histopathologique des rats traités par le gel diclofénac(E) a révélée une réaction inflammatoire moins intense, une membrane synoviale normale,une cavité articulaire synovial presque normal, avec formation d'un pannus synovial (Figure 43,F).

Des étude ont montré que l'induction de la polyarthrite par l'adjuvant Complet de Freund chez les rats provoque une prolifération et infiltration de la membrane synoviale dans la cavité synoviale et remplacement du cartilage articulaire par des cellules inflammatoires (Nandhagopal *et al.*, 2016) .La présence d'une hyperplasie synovium ,formation d'un pannus et destruction de l'espace articulaire est également apparus (Madhavi *et al.*, 2016)

Une étude menée par Chitme et Patel(2009) sur l'effet antiarthritique de l'extrait chloroformique de la plante *Aristolochia btracteata* a montré que ce dernier peut maintenir la membrane synoviale et le cartilage de se détruire par l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires et l'infiltration de la membrane synoviale.

Conclusion générale
et
Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail avait pour but de valoriser deux composants bioactifs les flavonoïdes et tanins extraits d'une plante médicinale du genre *Aristolochia* « *Aristolochia longa* » choisie sur la base de leur utilisation en médecine traditionnelle algérienne reconnue par son effet anticancéreux et d'étudier l'efficacité thérapeutique de deux formulations galéniques à base des flavonoïdes et tanins sur un modèle expérimental d'une inflammation chronique : l'arthrite rhumatoïde induite par adjuvant complet de Freund chez le rat Wistar.

L'étude phytochimique de la plante a mis en évidence la présence des flavonoïdes, des tanins et des coumarines.

D'après les résultats obtenus par analyse quantitative, et l'activité antioxydante, quatre extraits de fractions n-butanol flavonoïdique et tannique des feuilles et racines sont identifiées et présentent des activités anti radicalaires intéressantes dépendantes du contenu en flavonoïdes et tanins. Les profils de chromatogrammes révèlent la richesse de fraction n-butanol flavonoïdique de feuilles d'*Aristolochia longa* en flavonoïdes. Trois composants majeurs ont été mis en évidence : L'apigénine-8-C-hexoside, Apigenin-7-O-glucoside et kaempférol-3-O-glucoside. Tandis que, la fraction n-butanol tannique des racines figurée la présence de l'acide 1,3,4 -tri-O gallogliquinique et Vescalagin. Ces variations peuvent être due aux facteurs climatiques, au solvant utilisé, à la méthode utilisée et à la partie de la plante étudiée.

L'ensemble des résultats précédents, nous ont permis de sélectionner deux extraits de fraction n-butanol flavonoïdique et tannique qui n'ont présenté aucune toxicité cutanée aiguë

Les deux formes galéniques à base des extraits choisies préparées et analysées se sont révélées conformes et aucune irritation n'est observée.

L'effet thérapeutique des formes galéniques préparées, et testées sur un modèle expérimental d'une maladie inflammatoire chronique chez le rat Wistar : Arthrite rhumatoïde a montré que les rats induits non traités montrent une perte du poids corporel, une diminution remarquable des valeurs des marqueurs biochimiques de l'inflammation testés, alors le traitement par les pommades préparées a montré une restauration des marqueurs biochimiques (FR, CRP, calcémie, ALAT, ASAT et PAL) avec une différence dans le degré de l'efficacité du traitement.

L'examen radiologique a également révélé une résolution osseuse après le traitement par les pommades F1 et F2. La lecture histologique a montré une prolifération du cartilage articulaire caractérisée par une différence observée dans la reconstitution du cartilage.

Les résultats obtenus incitaient de décider sur l'importance de l'usage traditionnel des plantes médicinales dans le traitement de nombreuses maladies. Donc, il est intéressant de compléter cette étude par d'autres travaux dans le but :

- D'identifier et isoler d'autres molécules actives par l'utilisation d'autres méthodes d'extraction et de purification.
- Etudier la toxicité de substances bioactives purifiées en utilisant d'autres tests de toxicité adoptés selon les recommandations internationales.
- Préparer d'autres formes galéniques à base de nouvelles molécules bioactives isolées et évaluer approfondie leurs critères physicochimiques et microbiologiques.
- Evaluer *in vivo*, différentes activités biologiques des substances bioactives afin de connaître leurs modes d'actions et leurs efficacités thérapeutiques.

Références bibliographiques

- **Aanchal W, Gupta A .K., Vatsala S., 2019.** Role of Bioactive Compounds in Human Health. *Acta Scientific Medical Sciences*, 3(9) : 25-33.
- **Abdely C., 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331: 372-379.
- **Abdulkhaleq L. A., Assi M. A., Abdullah R, Zamri-Saad M., Taufiq-Yap Y. H., Hezmee M. N. M., 2018.**The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation. *Veterinary World*, 11(5): 627–635.doi: 10.14202/vetworld. 627-635
- **Abudunia A.M.,2018.** Etude phytochimique, screening biologique et pharmacologique des fleurs de *Calendula Arvensis*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V-Rabat.Pp.17.
- **Agar T.O., Dikmen M.,Ozturk N., Yilmaz M. A.,Temel H et Turkmenoglu F.P., 2015.**Comparative Studies on Phenolic Composition, Antioxidant, Wound Healing and Cytotoxic Activities of Selected *Achillea* L.Species Growing in Turkey. *Molecules*, 20, 17976-18000.Doi:10.3390/molecules 201017976.
- **Aho K., Heliövaara M., Maatela J., Tuomi T et Palosuo T., 1991.** Rheumatoid factors antedating clinical rheumatoid arthritis. *The J.Rheu.*18, 1282-1284.
- **Aiyalu R., Govindarjan A., Ramasamy A., 2016.** Formulation and evaluation of topical herbal gel for the treatment of arthritis in animal model *.Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 52, n. 3 .,http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502016000300015
- **Akindele A. J., Wani Z., Mahajan G., Sharma S., Aigbe F.R., Satti N., Adeyemi O. O., Mondhe D. M., 2015.** Anticancer activity of *Aristolochia ringens* Vahl. (*Aristolochiaceae*). *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 5, 35-41.
- **Amić D., Davidović -Amić D., Bećlo D et Trinajstić N., 2003.** Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. *Croat. Chem. Acta* 76 (1) 55–61.
- **Amri O., Zekhnini A.,Bouhaimi A., Tahrouch S., Hatimi A, 2018.** Anti-inflammatory Activity of Methanolic Extract from *Pistacia atlantica* Desf leaves. *Pharmacognosy Journal.*, 10(1):71-76.doi : 10.5530/pj.2018.1.14
- **Anam K., Widharna R.M., Kusriani, D., 2009.** α -glucosidase inhibitor activity of *Terminalia* species. *International Journal of Pharmacology.*, 5(4), 277-280.
- **Angalaparameswari S., Mohamed Saleem T.S., Alagusundaram M, et al., 2011.**Anti-microbial Activity of Aristolochic Acid from Root of *Aristolochia bracteata* Retz. *International Journal of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*.Vol:5, No: 9.

- **Aniya Y., Koyama T., Miyagi C, et al., 2005.** Free radical scavenging and hepatoprotective actions of the medicinal herb, *Crassocephalum crepidioides* from the Okinawa Islands. *Biol Pharm Bull.*; 28(1):19-23. doi:10.1248/bpb.28.19.
- **Anthony L M., 2017.** Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration (Oxf).* 4(2). pp. 39-53.
- **Ardekani M. R. S., Rahimi R., Javadi B., Abdi L., Khanavi M, et al 2011.,** Relationship between Temperaments of Medicinal plants and their Major Chemical Compounds. *journal of traditional Chinese Medicine.* 31: 27-31.
- **Ashley T .N., Weil Z. M., Nelson R .J., 2012.** Inflammation: mechanisms, costs and natural variation. *Annual Review*, 43. pp. 385-406.
- **Attiq A., Jalil J., Husain K et Ahmad W., 2018.** Raging the War against Inflammation with Natura Products. *Frontiers in Pharmacology.*, Vol 9, Article 976. doi: 10.3389/fphar.2018.00976.
- **Azab A, Nassar A and Azab A.N., 2016.** Anti-Inflammatory Activity of Naturals Products, *molecules*, 21, 1321. Doi:10.3390/molecules21101321.
- **Ba K., Tine E., Destain J., Cisse N., Thonart P., 2010.** Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. *Biotechnol Agro Soc Environ*, Vol 14, pp 131-139.
- **Baba Aissa ., 1999.** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb : substances végétales d'Afrique *first ed. Edition moderne*, Rouiba, Algérie. P368.
- **Badiwa-Bizowe B., 2007.** Evaluation des effets immunotoxique chez les souris adultes et juvéniles C57B1/6 exposées dans leur diète à du poisson contaminé au chlorure de tributylétain .Thèse de Maitre en Science (M.Sc) en sciences expérimentales de la santé. Université du Québec. Pp06.
- **Balunas M. J., Kinghorn A. D., 2005.** Drug discovery from medicinal plants *.Life Sciences*, 78 (2005) 431– 441
- **Bammi J et Douira A., 2002.** Les plantes medicinales dans le foret de l'achach (plateau central, MAROC) *Acta Botanica Malacitana* , 27: 131-145 Málaga.
- **Bansod M. S., Virendra G. K, Rohini R. P., Vivek B. P., Hardik H. A., 2011.** Therapeutic effect of a polyherbal preparation on adjuvant induced arthritis in wistar rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* vol 3, suppl 2, 186-192.

- **Bargiacchi E., Campo M., Romani A., Milli G., et Miele S., 2017.**Hydrolysable Tannins from Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) to improve Tobacco and Food/Feed Quality. *AIMS Agriculture and Food*, 2(3): 324-338 doi: 10.3934/agrfood.2017.3.324
- **Bartels C. M. et Bridges A. J., 2010.**Rheumatoid Vasculitis: Vanishing Menace or Target for New Treatments? *Curr Rheumatol Rep.* December,12(6): 414–419. doi:10.1007/s11926-010-0130-1.
- **Beddou F., 2015.** Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes sahariennes *Rumex Vesicarius* L et *Anvilla radiata* Coss et Dur.Thèse de Doctorat .Université de Abou Bekr Belkaid. Pp102.
- **Bekdouche F., derrid J.A., Krouchi F., 2008.** Evaluation après feu de la composition floristique de la subéraie de Mizrana (Tizi-Ouzou, Algérie). *Science and technologie C.* (28) : 19-29.
- **Belkhodja H., Meddah B., Tir Touil A.,Sonnet P., 2016.** Effect of Essential Oils of Rosmarinus Officinalis and Populus Alba in Biomarkers Level in Osteoarthritis Experimental ModelJ. *Appl. Environ. Biol. Sci* 6 (5), 35-42.
- **Bellamine K., 2017.** La phytothérapie clinique dans les affections dermatologiques. Thèse de doctorat en pharmacie. Universite Mohammed v – Rabat. Pp10-25-26.
- **Bemfield M., Kokenyesi R., Kato M., Hinkes M.T., Spring J., Gallo R.L., et Lose E.J., 1992.** Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 365-398.
- **Benarba B., Ambroise G., Aoues A., Meddah B., Vazquez A., 2012.** *Aristolochia longa* aqueous extract triggers themitochondrial pathway of apoptosis in BL41 Burkitt's lymphoma cells. *International Journal of Green Pharmacy.*45-49.
- **Benarba B., Meddah B., 2014.** Ethnobotanical study, antifungal activity, phytochemical screening and total phenolic content of Algerian *Aristolochia longa*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology* .Doi: 10.5455/jice.20140826030222.
- **Bene K., Camara D., Soumahoro I.A., Kanga Y., Zirihi G.N., 2017.**Formulation galénique d'une pommade antimicrobienne à base d'un extrait hydroalcoolique de *Bersama abyssinica* Fresen. *Ethnopharmacologia*, n°58.Pp60-69.
- **Benkhniq O., Ben Akka F., Salhi S., Fadli M., Douira A et Zidane L., 2014.** Catalogue des plantes médicinales utilisées dans le traitement du diabète dans la région d'Al Haouz-Rhamna (Maroc) *Journal of Animal &Plant Sciences.* Vol.23, Issue 1: 3539-3568

- **Benfreha A., 2018.** Polyarthrite rhumatoïde : de la physiopathologie à la thérapie. Thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Limoges. Pp84
- **Benzakour G., Amrani M., Oudghiri M.,2012.**A Histopathological Analyses of in vivo Anti-tumor Effect of an Aqueous Extract of *Aristolochia longa* Used in Cancer Treatment in Traditional Medicine in Morocco. *International Journal of Plant Research*, 2(2): 31-35 Doi: 10.5923/j.plant. 20120202.06
- **Beto J.A., 2015.**The Role of Calcium in Human Aging. *Clinical Nutrition Research*; 4:1-8. <https://doi.org/10.7762/cnr.2015.4.1.1>
- **Bhosale A. M. et Richardson J. B., 2008.** “Articular cartilage: structure, injuries and review of management,” *Br. Med. Bull.*, vol. 87, no. 1, pp. 77–95.
- **Bonesi M., Loizzo M.R., Provenzano E., F. Menichini and R. Tundis, et al., 2016.** Anti-Psoriasis Agents from Natural Plant Sources.*Current Medicinal Chemistry*; 23:1250-1267.
- **Biyiti L.F., Tamze V., Nnanga N., Agbor G. Agbor., Gangoue-Pieboji J., 2012.** Formulation d’une pommade antibactérienne à base d’un extrait éthanolique des écorces du tronc de *Tabernaemontana crassa* Benth, Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine, volume 6.
- **Bougandoura N., Bendimerad N., 2013.** Evaluation de l’activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *satureja calamintha ssp.Nepeta* (L) Briq.*Nature et Technologie.B.Sciences Agronomiques et Biologiques* ; vol.9 :pp.14-19.
- **Boukhatem M. N., Hamaidi M. S., Saidi F., HakimY, Benomier K., 2010.** Extraction, composition et valorisation de l’eau aromatique de géranium rosat (*Pelargonium graveolens*) dans la dermopharmacie. Revue « *Nature et Technologie* ». n° 02/Janvier 2010. Pages 59 -64.
- **Boukhira S., Balouiri M., El Mansouri L., El Hamsas E- Y.A, Bouarfa M, et al ., 2017.**Development of Natural Preservative from *Silene vulgaris* Extract in Topical Formulation under a Challenge Test and its Stability Study. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7 (04); 2017: 142-148 145.
- **Boukhira S., 2017.**Vers d’innovants conservateurs naturels pour la cosmétique: Applications du challenge test et évaluation de leurs activités biologiques. Thèse de Doctorat. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah Dhar El Mahraz- Fès.Pp63.
- **Boutet M-A., 2016.** Expression et intérêt thérapeutique de l’interleukine 38 dans la polyarthrite rhumatoïde. Thèse de Doctorat. *L’Université de Nantes -Bretagne Loire-* pp31.

- **Brito A., Ramirez J.E., Areche C., Sepúlveda B et Simirgiotis M.J.,2014.**HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile, *Molecules*, 19, 17400-17421; doi:10.3390/molecules191117400
- **Cai Y.,2016.**, Recent Advances in Anticancer Activities and Drug Delivery Systems of Tannins. 2016. *Medicinal Research Reviews*, 00, No. 0, 1–37, 2016. Doi 10.1002/med
- **Calabresi E., Petrelli F., Bonifacio A.F., Puxeddu I., Alunno A., 2018.** Review .One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 36: 175-184.
- **Capasso F., Gaginella T.S., Grandolinin G et Izzo A.A.,2003.** Phytotherapy.AQuik reference to Herbal Medecine.Springer-Verlag berlin Heidelberg-New York in 2003..Library of Congress Cataloging –in –Publication Data.Doi 10.1007/978-3-642-55528-2.Pp45.
- **Carlson R.P., Datko L.J., Lynn O.N., Frank D., Beideman R., LewisA.J., 1985.** Comparison of inflammatory changes in established type-II collagen and adjuvant-induced arthritis using outbred wistar rat. *Int. J. Immunopharmacol.*, 7(6), 811-826.
- **Chabrier Jean-Yves., 2010.** Plantes médicinales et formes d'utilisation en Phytothérapie. Thèse de Doctorat en pharmacie. Universite Henri Poincare - Nancy 1.Pp 20-23-94-146.
- **Charrié J-C., Hedayat K., Chastel B., Cieur-Tranquard C., Combe P., Damak M, et al.2017.** Plantes médicinales: phytothérapie clinique intégrative et médecine endobiogénique. Lapraz J-C, éditeur. Paris, France: *Lavoisier Tec & Doc*. Pp215.
- **Chavan U-D ., Shahidi F., Naczk M., 2001.**Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.)as affected by different solvents. *Food Chemistry*, 75, 509-512.41–48
- **Chen L., Deng H., Cui H., Fang J., Zuo Z, et al., 2018.** Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs., Vol. 9, (No. 6), pp: 7204-7218
- **Cherif H.S., Saidi F., Boutoumi H., Rouibi A., Chaouia C., 2009.**Identification et caracterisation dequelques composes chimiques chez *Aristolochia longa* L. *Agricultura – Știință și practică* nr. 3-4 (71-72).
- **Cherif H-S., 2012.** Caractérisation biochimique, histologique et physiologique d'une plante médicinale *Aristolochia longa* L(Beroustrom) .Thèse de Doctorat.Université Saad Dahlab de Blida.

- **Chevalier X., Richette P., 2005.** “Cartilage articulaire normal: anatomie, physiologie, métabolisme, vieillissement,” EMC - *Rhumatol.-Orthopédie*, vol. 2, no. 1, pp. 41–58.
- **Chitme H.R., Patel N.P., 2009.** Antiarthritis activity of *Aristolochia bracteata* extract in experimental animals. 6 *The Open Natural Products Journal*, 2, 6-15.doi: 10.2174/1874848100902010006
- **Chitme H.R, Malipatil M., Chandrashekhar V.M., Prashant P.M., 2010.** Antiallergic activity of *Aristolochia bracteolata* Lank in animal model. *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol. 48, pp. 46-52.
- **Choudhary M., Kumar V., Kumar G. P., Singh S., 2014.** Anti-arthritic activity of *Barleria prionitis* Linn leaves in acute and chronic models in Sprague Dawley rats. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 52, 199–209. ELSEVIER. doi.org/10.1016/j.bfopcu.2014.07.002
- **Clifford M.N., Stoupi S et Kuhnert N., 2007.** Profiling and Characterization by LC-MSn of the Galloylquinic Acids of Green Tea, Tara Tannin, and Tannic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 2797-2807.
- **Combe B., 2004** « De l’immunopathologie aux traitements de la polyarthrite rhumatoïde », *Immuno-Rhumatologie*, Hôpital Lapeyronie, CHU de Montpellier - Université Montpellier I .France.
- **Coulibaly E., 2009.** Contrôle de qualité et formulation galénique (granulés, comprimés) de la poudre de pulpe du fruit d’*Adansonia digitata* L. (Bombacaceae). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Bamako. Pp49.
- **Couture A., Deniau E., Grandclaoudon P., Rybalko-Rosen H., Léonce S., Pfeiffer B.,Renard P., 2002.** Synthesis and Biological Evaluation of Aristolactams. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12, 3557–3559.
- **Culioli G ., 2016.** Place de la nutrition dans la polyarthrite rhumatoïde. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Rennes, Bretagne Loire .Pp33,39,40, 66.
- **Dahmani M.M., 2019.** Evaluation de l’activité biologique des polyphénols de *Carthamus, caeruleus* L (*Asteraceae*), Thèse de Doctorat, Université de M’hamed Bouguera-Boumerdes. Pp23.
- **Dally L., Coulibaly S., Angnimel L.H., Bamba M., 2007.** Formulation, contrôle galénique, toxicologique et essai biogalénique d’une crème à activité cicatrisante à base de feuilles fraîches de *Baphia Nitida* (Papilionacées). *J. sci. pharm. biol.*, Vol.8, n°1 , pp. 33-40

- **Dar R.A., Shahnawaz M., Rasool S., Qazi P. H., 2017.** Natural product medicines: A literature update. *The Journal of Phytopharmacology*, 6(6): 340-342.
- **Deepa T.,Kamalakaran P., Elamathi R., Kavitha R et Sridhar S., 2012.** Studies on antibacterial, antifungal activity and phytochemical analysis of *Aristolochia bracteata* Retz.*J Chemical and Pharmaceutical Research*, 2012, 4(3):1449-1453.
- **Dembélé D. L., 2011.** Formulation de pommade antalgique et anti-inflammatoire a base de *Securidaca longepedunculata* Fresen (Polygalaceae). Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Bamako.Pp38, 44
- **Derouiche S., Zeghib K., Gharbi S., Khelef Y., Feriani A., 2017.**Protective effects of *Aristolochia longa* and *Aquilaria malaccensis* against lead induced acute liver injury in rats. *Journal of Acute Disease*; 6(5): 193-197 .Doi: 10.4103/2221-6189.219611
- **Dhanabal S. P., Dwarampudi L. P., Muruganantham N.,Vadivelan R., 2012.** .Evaluation of the antipsoriatic activity of *Aloe vera* leaf extract using a mouse tail model of psoriasis. *PhytotherapyResearch Phytother. Res.* 26: 617–619 (2012) .DOI: 10.1002/ptr.3589.
- **Dhouiouia M., Boulila A, Chaabane H., Zina M. S., Casabianca H., 2016.** Seasonal changes in essential oil composition of *Aristolochia longa* L.ssp. *paucinervis* Batt. (*Aristolochiaceae*) roots and its antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products* 83, 301–306. doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.025
- **Diarra R., 2008.**La polyarthrite rhumatoide : caractères clinique, biologique et radiographique dans le service de rhumatologie au chu du point .Thèse de doctorat en Médecine. Université de bamako.Pp10, 19
- **Dietrich H., Rechner A., Patz C.D., 2004.** Bioactive compound in fruit and juice. *Fruit Process.*; 1:50-55.
- **Djeridane A., Yousfi M., Brunel J.M., Stocker P.,2010.**Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food Chem Toxicol* 48:2599–606
- **Djeridane A.,Yousfi M.,Nadjemi B.,Maamri S.,Djireb F et Stocker P .,2006.**Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase .*Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* ,December 2006;21(6):719-726

- **Draize, J. H., 1959.** Dermal toxicity. In: *Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods Drugs, and Cosmetics*, pp. 46-59. Association Food and Drug Officials of U.S., Austin, Texas.
- **Dubois Elodie., 2015.** Elaboration et essais préliminaires d'un protocole experimental *in vitro* permettant d'évaluer l'influence de liquides synoviaux issus d'articulations arthrosiques de cheval sur les cellules stromales mesenchymateuses. Thèse de Docotrat en medecine vétérinaire. Universite Claude-Bernard - Lyon I (Médecine - Pharmacie).Pp22, 34,36.
- **Durairaj T., Alagappan C., Suresh S-S.R et Ramasamy V.,2018.**An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. Chapter1 .doi.org/10.5772/intechopen.79766.
- **Ebrahimzadeh M.A.,Nabavi S.M.,Nabavi S.F.,Bahramian F et Bekhradnia A. R.,2010.**Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. Officinalis L. Var. Angustifolius, V. Odorata, B. Hyrcana* and *C. Speciosum* .*Pak. J. Pharm. Sci.*23(1), pp.29-34.
- **Eden W.V., Holoshitz J., Nevo Z., Frenkel A., Klajman A.,1985.** Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to *Mycobacterium tuberculosis* and to cartilage proteoglycans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 82, pp. 5117-5120.
- **Ekambaram S.P., Perumal S.S., Balakrishnan A., 2016.** Scope of Hydrolysable Tannins as Possible Antimicrobial Agent. *Phytother Res.* 30: 1035–1045.
- **El Hayek E., Chauvet C., Rannou F., 2013.** Cartilage articulaire, stress mecanique et arthrose. *Actualités en Médecine Physique et de Réadaptation*;1:12-6.
- **El Kassouani Nadia., 2013.** Les produits cosmetiques pour les soins du visage. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Mohammed V, Rabat. Pp30
- **El Omari N .,Sayah K., Fettach S., El Blidi O., Bouyahya A., et al.,2019.**Evaluation of *In Vitro* Antioxidant and Antidiabetic Activities of *Aristolochia longa* Extracts .Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. <https://doi.org/10.1155/2019/7384735>.,2019.
- **Elsayed, E.A., El Enshasy H., Wadaan M. A. M., and Aziz R., 2014.** A potential natural source of anti-inflammatory compounds for medical applications. Mediators of Inflammation. Doi.org/10.1155/2014/805841.
- **Eyang -Esseng M., 2007.** Etude de la phytochimie et des activités antibactériennes et antifongiques de cinq plantes médicinales utilisées dans le traitement traditionnel des dermatoses au Mali, Thèse de Doctorat en medecine. Université de Bamako, Mali.Pp31

- **Falgarone G., Nahon P., Boissier M.C., 2013.**Atteintes hépatiques de la polyarthrite rhumatoïde. *L'Actualité rhumatologique.Elsevier Masson SAS.* Chapitre 2.
- **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. 2008.** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331: 372-379.
- **Ferrara G., Petrillo G. M., Giani Teresa., Marrani E., Filippeschi C, et al., 2019.**Clinical Use and Molecular Action of Corticosteroids in the Pediatric Age. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 444; doi:10.3390/ijms20020444.
- **Fokunang C. N., Fokunang E. T., Frederick K, Ngameni B., Ngadjui B.,2018.** Overview of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *MOJ Toxicology*; 4(1):5–13.
- **Fox A. J. S., Bedi A, and Rodeo S.A., 2009.** The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. ” *Sports Health Multidiscip. Approach*, 1 (6):pp461-8 .Doi: 10.1177/1941738109350438.
- **Friedman L. S., Keeffe E. B., 2004.** Handbook of Liver Disease, third 2nd edition. *Elsevier.* Saunders.Pp.111.
- **Galois Laurent., 2003 .**bioingenierie du cartilage et arthrose experimentale. Docteur en biologie sante et environnement. Thèse de doctorat en Medecine.Université Henri Poincare - Nancy1.Pp19, 22.
- **Garnier, M. D. ,2004.** Dictionnaire illustre des termes de medecine (ed. 28e). Paris: Maloine.
- **Gerhard V.H.:** Drug discovery and evaluation, pharmacological assa, y Second edition 2002, p 802-803.
- **Gerhard W., 2014.** La polyarthrite rhumatoïde de l’adulte : stratégies thérapeutiques et concept du patient-expert.Thèse de doctorat en pharmacie .Université De Lorraine.Pp 68,74.
- **Ghulam H., Jia H., Azhar R., Haseeb A., Ali I, et al., 2019.**Putative Roles of Plant-Derived Tannins in Neurodegenerative and Neuropsychiatry Disorders: An Updated Review. *Molecules*, 24, 221. Doi: 10.3390/molecules24122213.
- **Gollucke A.P., Aguiar O J.R., Barbisan L.F., Ribeiro D.A., 2013.** Use of grape polyphenols against carcinogenesis: putative molecular mechanisms of action using in vitro and in vivo test systems. *J Med Food* 16:199–205.
- **Górniak I., Bartoszewski R., Króliczewski J., 2018.** Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews .Fundamentals and Perspectives of Nat Prod Res.*vol 15, N 6.Do. 10.1007/s11101-018-9591-z.

- **Gounoue K R., Noukeu K.B A., Tsakem N.M. J., Youmsi F. D., Ngueguim T. F, et al.,2019.** Anti-inflammatory potential of *Tapinanthus globiferus* (Loranthaceae) leaves as an alternative treatment against arthritis. *The J. Phytopharmacology*; 8(3): 96-103
- **Guinnin F. D. F., Sacramento T.I.,Ategbó J-M., Agbangnan C. D. P., 2016.,** .Physico-chemical composition and radical scavenging activity evaluation of the extracts of *Aristolochia albida* Duch. (*Aristolochiaceae*) of Benin. *Jor of Appl Bios*, 107: 10460-10470. Doi.org: 10.4314/jab.v107i1.11
- **Gundula S-T., 2019.** Intraarticular Ligament Degeneration Is Interrelated with Cartilage and Bone Destruction in Osteoarthritis. Review. *Cells*, 8, 990.Doi: 10.3390/cells8090990
- **Hammiche V., Merad R., Azzouz M ., 2013.** Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Springer Paris Berlin Heidelberg New York. Pp 299.
- **Hayder M.,2011.** Utilisation d'un Dendrimère Phosphoré comme une Nouvelle Approche Thérapeutique de la Polyarthrite Rhumatoïde.Thsèse de Doctorat en immunologie. l'Université Toulouse III - Paul Sabatier.France.Pp58
- **Hernández MV, Sanmartí R, Cañete JD., Descalzo M.A., Alsina M., et al., 2013.** Cutaneous adverse events during treatment of chronic inflammatory rheumatic conditions with tumour necrosis factor antagonists. Study based on the Spanish Registry of Adverse Events of Biological Therapies in Rheumatic Diseases. *Arthritis et Care Research*; 65:12, 2024-2031. Doi 10.1002/acr.22096.
- **Hildebrandt, G., Jahns J., Hindemith M., Spranger S., Sack U., et al., 2000.** Effects of low dose radiation therapy on adjuvant induced arthritis in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* 76:8, 1143-1153.
- **Iloki-Assanga S.B, Lewis-Luján L.M., Lara-Espinoza C.L., Gil-Salido A.A. Fernandez-Angulo D, et al., 2015.** Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res Notes* 8:396. Doi 10.1186/s13104-015-1388-1
- **Jahnavi K.,Pavani Reddy P, Vasudha B, Narender B, et al., 2019.**Non-steroidal anti-inflammatory drugs: an overview. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics.*; 9(1-s):442-448 .Doi.org/10.22270/jddt.v9i1-s.2287.

- **Janani N et Revathi K., 2018.** *In vitro* evaluation of *Aristolochia indica* for its anti-inflammatory Antidiabetic and Anticancer Efficacy. *International Journal of Current Research in Medical Sciences*. Volume 4, Issue (6): 23-30. Doi: <http://dx.doi.org/10.22192/ijcrms.2018.04.06.004>
- **Jayasutha J., Nithila S.M.J., 2011.** Evaluation of Wound healing activity of Ethanolic extract of *Aristolochia bracteata* and *Cassia tora* on Wistar Albino rats. *International Journal of Pharm Tech Research*. Vol.3, No.3, pp 1547-1550.
- **Jegadeeswari P., Daffodil E.D., Mahan V.R., 2014.** Quantification of total phenolics, flavonoid and *in vitro* antioxidant activity of *Aristolochia bracteata* Retz. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014; 6(1):747-752.
- **Kampkötter A., Gombitang N.C., Zurawski R.F, Timpel C., Chovolou Y, et al., 2007.** Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch Toxicol*;81(12):849-858. Doi:10.1007/s00204-007-0215-4.
- **Kandouli C., 2018.** Etude des propriétés antidiabétiques, antioxydantes et antiinflammatoires des extraits hydrosolubles d'*Anvillea* Coss. & Dur sur le diabète de type 2 expérimental induit par le régime (high fat) chez la souris C57/BL6J. Thèse de Doctorat en Science en Biologie Cellulaire et Moléculaire. Université Des Frères Mentouri, Constantine. Pp31.
- **Kaplan A, et al., 1984.** Aspartate aminotransferase. *Clin Chem The* .VC Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. 1112-1116.
- **Karnati M., Chandra R.H., Veeresham C., Kishan B, et al 2013.** Anti-arthritis activity of root bark of *Oroxylum indicum* (L.) vent against adjuvant-induced arthritis. *Pharmacognosy Research* .Vol 5 Issue 2. Doi: 10.4103/0974-8490.110543
- **Kernouf Nassima., 2019.** Effet des extraits de *Capparis spinosa* sur la production des médiateurs inflammatoires des neutrophiles et des monocytes. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Ferhat Abbas Sétif 1. Pp21
- **Khaled-Khodjaa N., Boulekbache-Makhlouf L., Madani K., 2014.** Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products* 61 (2014) 41–48.
- **Kim D.O., Chun O.K., Kim Y.J., Moon H.Y., Lee C.Y. 2003.** Quantification of polyphenols and their antioxidant capacity in Fresh Plums. *J. Agr. Food. Chem* ; vol.51: pp.6509-6515.

- **Kingsley U.I., Elochukwu A.C., Nwosu T.F., 2017.** Critical review of hypercalcemia. *Journal of Medical and Allied Sciences*, 7 (1): 03-08.
- **Kirassian Cybèle., 2015.** Le cassis et la reine des prés : deux plantes aux propriétés anti-inflammatoires. Université Claude-Bernard - Lyon I .Thèse de doctorat en médecine vétérinaire. Pp 87, 92.
- **Kozłowska A, Szostak-Węgierek D., 2014.** Flavonoids - Food Sources and Health Benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig*;65(2):79-85
- **Koilpitchai P., Pious Soris T., Veerabahu R.M., 2016.** Investigation of anti-inflammatory activity of *Aristolochia krisagathra* Sivarajan and Pradeep. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, , 5(3):132-135
- **Krishnananda P. I., Dipika A. P., Khelurkar V. C., 2016.** Secondary Metabolites for Plant Growth Promotion and Plant Protection. *REVIEW PAPER Advances in Life Sciences* 5(23), Print : ISSN 2278-3849, 10888-10891.
- **Kumar V. L., Roy S., Sehgal R et Padhy B. M., 2006.** A comparative study on the efficacy of rofecoxib in monoarticular arthritis induced by latex of *Calotropis procera* and Freund's complete adjuvant. *Inflammopharmacology* 14 (2006) 17–21 .Doi 10.1007/s10787-006-1512-x
- **Kuo P.C., Li Y.C., Wu T.S., 2016.** Chemical constituents and pharmacology of the *Aristolochia* species. *Journal of Traditional and complementary medicine*. Vol.2, N4, pp249-266.
- **Kutchan T.M., 2001.** Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. *Plant Physiology*, 125 : 58- 60.
- **Lagha S., 2007.** Effet des extraits de plantes (*Pistacia lentiscus* Let *Olea europaea sativa*) et d'un co-produit (grignon d'olive) sur la croissance de *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* sur *Solanum tuberosum* L. Mémoire de Magister Université Abderrahmane Mira – Bejaia. Pp23
- **Lahsissene H., kahouadji A., tijane M., hseini S., 2009.** Catalogue Des Plantes Médicinales Utilisées Dans la Région De Zaër (Maroc Occidental). *Lejeunia. Revue de botanique Nouvelle série* N° 186.
- **Lamkinsi H., Lachkar. M., Cherrah Y., Alaoui K., 2016.** Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Ceratonia siliqua* L. methanol barks extract. *J. Chem. Pharm. Res.*, 8, 202–210.
- **Laudatoa M., Pescitellia L., Capasso R., 2013.** Natural Products of Mineral Origin. *Natural Product Communications*. Vol. 8. No.3. 419 – 423.

- **Lawrence T., Gilroy D., 2008.** The resolution of acute inflammation: a ‘tipping point’ in the development of chronic inflammatory diseases. *In: Rossi A.G. and Sawatzky D.A. The resolution of inflammation; progress in inflammation research. Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, pp; 1-4.*
- **Le Hir A., Chaumeil J-C., Brossard D., 2009.** Pharmacie galénique. Bonnes pratiques de fabrication des médicaments 9^{ème} édition .Collection des Abrégés de pharmacie, ElSivier Masson SAS –Paris.382pages. ISBN : 978-2-294-61204-6.Pp36, 37,53-86
- **Lebreton E., 2014.** Plantes à usage cutané chez l’enfant. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université Joseph Fourier.France.Pp12
- **Li Y., Kakkar R et Wang J., 2018.** *In vivo* and *in vitro* Approach to Anti-arthritis and Anti-inflammatory Effect of Crocetin by Alteration of Nuclear Factor-E2-Related Factor 2/hem Oxygenase (HO)-1 and NF-κB Expression. *Frontiers in Pharmacology*, 9. Doi:10.3389/fphar.2018.01341
- **Limdi J. K., Hyde G.M., 2003.** Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgrad Med J*; 79:307–312.
- **Limdi J. K., Hyde G.M., 2018.** Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgraduate Medical Journal*, 79(932), 307–312. Doi:10.1136/pmj.79.932.307
- **Limonier A.S., 2018.** La Phytothérapie de demain : les plantes médicinales au cœur de la pharmacie. Thèse de Doctorat en Pharmacie .Rrance .Pp12-28-29-31
- **Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Jülich W.D., 2005.** The pharmacological potential of mushrooms. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2, 285–299.
- **Liu C.H., Abrams N. D, Carrick D. M., Chander P., Dwyer J., Hamlet M.R.J, et al., 2017.** Biomarkers of chronic inflammation in disease development and prevention: Challenges and opportunities. *Nat. Immunol.*, 18,1: 1175–1180.
- **Lompo M., 1999.** Activite anti-Inflammatoire des extraits d'ecorces de tronc *Dekhaya senegalensis A. Juss (Meliaceae)*. Mise au point d'une forme galenique topique (Phase 1).Thèse de doctorat en Pharmacie. Universite d’Ouagadougou. Faculté des sciences et techniques. Pp46
- **Luna L.G., 1992.** Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. 1992, Gaithersburg, MD: American Histolabs. 767 p.
- **Macáková K., Kolečkář V, Cahlíková L, Chlebek J., Hošťálková A, et al., 2014.** Tannins and their Influence on Health. *Recent Advances in Medicinal Chemistry, Vol. 1:*159-208.

- **Madhavi G., Patel A., Kilambi P.B., 2015.**Anti-arthritis activity of a classical Ayurvedic formulation VatariGuggulu in rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. Doi.org/10.1016/j.jtcme.2015.08.007
- **Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C., 2008.**Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica acta*. 613.1-9. Doi:10.1016/j.aca.2008.02.047
- **Mahboubi M., Kazempour N., 2015.** The anti-dermatophyte activity of *Allium hirtifolium* Boiss aqueous extract. *J Mycol Med*; 25(1):e10-4.
- **Mamadou L. D., 2009.** Contrôle de qualité et formulation galénique (sirop) de la pulpe de fruit de *Tamarindus indica* Linn (*Caesalpinaceae*). Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de Bamako. Pp14
- **Manabe Ichiro., 2011.**Chronic Inflammation Links Cardiovascular, Metabolic and Renal Diseases. Official Journal of the Japanese Circulation Society. *Circulation Journal*. Vol.75.
- **Mansour S., 2015.** Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : *Artemisia absinthium* L, *Artemisia herba alba* Asso et *Hypericum scarboides*- Etude *in vivo*-. Thèse de Doctorat en science. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf. Pp13
- **Marchand G., Barrette M.C., Lesage J., Larue M., 2011.** Laboratory methods, enumeration of culturable bacteria and mold from the air taken from polycarbonate filter. Posted by IRSST.
- **Marín L., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F., 2015.** Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int* , 905215.
- **Marnell L., Mold C., Clos T.W. Du., 2005.** C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. Short Analytical Review *Clinical Immunology*, 117, 104 – 111. Doi:10.1016/j.clim.2005.08.004
- **Masunda T.A., Mbala M.B., Kayembe S.J., Longoma B.F., Ngbolua K.N, et al., 2014.** Activité anti-hyperglycémique et antiradicalaire des extraits des fruits de *Raphia gentiliana* De Wild. (*Areaceae*). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 8(6): 2441-2451, 2014
- **Matthew E. B., Benjamin D., Michael A. P., 2019.** Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. *Review Molecules*, 24, 3961; doi:10.3390/molecules24213961

- **Mazières B., Contagrel A., Constantin A., 1999.** La polyarthrite rhumatoïde. Guide pratique de Rhumatologue; 307-327.
- **Mbiantcha M., Almas J., Shabana S.U., Nida D., Aisha F., 2017.** Anti-arthritic property of crude extracts of *Piptadeniastrum africanum* (Mimosaceae) in complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*; 17:111. Doi 10.1186/s12906-017-1623-5.
- **Mc Gettigan P., Henry D., 2013.** Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. *Plos medicine* 10, e1001388.
- **Mebarki N., 2010.** Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse – antimicrobienne. Diplôme de Magister. Université M'hamed Bougara Boumerdes. Pp 55.
- **Merouani N., Belhattab R., Sahli F., 2017.** Evaluation of the biological activity of *Aristolochia longa* L. extracts. *Int J Pharm Sci Res*; 8(5):1978-1992. doi:10.13040/ijpsr.0975-8232.
- **Mesli-Bestaoui k., Bouazza M., Godron M., 2007.** Etude des groupements végétaux des mots de Tlemcen et de leurs facies de dégradation par deux approche : les profils écologiques et les liaisons interspécifiques (ORANIE- ALGERIE). *Sciences et Technologie*, (25) ,71- 78.
- **Min-Hsiung P., Ching-Shu L., Chi-Tang H., 2010.** Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and function*, 1, 15–31. Doi: 10.1039/c0fo00103a
- **Mondal P., Das S., Mahato K., Borah S., Junejo J.A., Zaman K., 2016.** Evaluation of anti-arthritic potential of the hydro-alcoholic extract of the stem bark of *plumeria rubra* in freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats., Vol. 7(9): 3675-3688. . *Int. J Phar. Sc. Res.* Doi .org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7 (9).3675-88
- **Mohammedi Z., 2013.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie .Thèse de Doctorat. Université de Abou Bakr Belkaid. Pp22, 83-85.
- **Morel J et Combe B., 2004.** Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. Pathogeny of rheumatoid arthritis. Service d'immunorhumatologie, CHU Lapeyronie, Montpellier et unité Inserm U454. 20 La Lettre du Rhumatologue - n° 306 - novembre 2004.
- **Muther L., 2015.** Utilisation Des Huiles Essentielles Chez L'enfant. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculte de Pharmacie de Clermont Ferrand. Pp74.

- **Murugan M et Mohan V. R., 2012.** Efficacy of different solvent extracts of *Vitex trifolia* L. and *aristolochia indica* L. for potential antibacterial activity. *Science Research Reporter* 2(1): 110-114.
- **Nacz M et Shahidi F., 2004.** Phenolics in cereals fruits and vegetables: occurrence extraction and analysis. *Journal of Ph and Bio Analy.* Vol.41. pp1523-1542.
- **Nandhagopal K., Kanniyakumari M., 2016.** Effect on the biochemical and hematological parameters on *Rasa Mezhu* in Freund's adjuvant-induced arthritis rats. *World J Pharm Sci*, 4(10): 81-85.
- **Nanke Y., Kotake S., Akama H., Kamatani N., 2002.** Alkaline Phosphatase in Rheumatoid Arthritis Patients: Possible Contribution of Bone-Type ALP to the Raised Activities of ALP in Rheumatoid Arthritis Patients. *Clin Rheumatol* 21:198–202.
- **Nardi E., 2009.** *Aristolochiaceae*. – In: Euro+Med Plantbase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity.
- **Neinhuis C., Wanke S., Hilu K.W., Muller K., Borsch T., 2005.** Phytoeny of *Aristolochiaceae* based on parsimony, Likelihood and Bayesian analyses of trnL-trnF. *Plant Syst Evol*; 250:7-26.2. Doi: 10.1007/s00606-004-0217-0.
- **Nicolin V., Tommasi N. D., Nori S. L., Costantinides F., Berton F., Lenarda R.D., 2018 .**Modulatory Effects of Plant Polyphenols on Bone Remodeling: A Prospective View From the Bench to Bedside. *Frontiers. Endocrinology.*, Volume 10, article 494 <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00494>.
- **Nile S.H., Park S.W., 2014.** Edible berries: bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*; 30: 134–144.
- **Nisar B., Sultan A., Rubab S. L., 2017.** Comparison of Medicinally Important Natural Products versus Synthetic Drugs-A Short Commentary. *Natural Products Chemistry & Research*. 2017, 6:2. Doi: 10.4172/2329-6836.1000308.
- **Njoku V.O., Obi C., 2009.** Phytochemical constituents of some selected medicinal plants. *African Journal of Pure Applied Chemistry*; Vol 3(11):pp228-233.
- **Noble P., Collin B., Lecomte-Beckers J., Magnée A., Denoix J-M., Serteyn D., 2010.** L'articulation synoviale: un système tribologique parfait. Formation continue - Articles de synthèse, *Ann. Méd. Vét.*, 154, 83-93.
- **Nortier J., Pozdzik A., Roumeguere T., Vanherweghem J-L., 2013.** Néphropathie aux acides aristolochiques (« néphropathie aux herbes chinoises ») EMC - Néphrologie 1. Volume 10, n°2.

- **OCDE, 2008** .Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques .Toxicité orale aigue .Methodes par classe de toxicité aigue. Pp 3-10
- **OCDE (402),, 1987** .Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques .Toxicité cutanée aigue .Methodes par classe de toxicité aigue.Pp1-8.
- **Okhale S. E., Egharevba H. O., Okpara O. J., Ugbabe G. E., Ibrahim J. A, et al., 2019.**Aristolochic acids in herbal medicine: Public health concerns for consumption and poor regulation of botanical products in Nigeria and West .*Africa Journal of Medicinal Plants Research*. Vol. 13(3). Pp. 55-65, 10
- **Oraya M., Abu Samraa K., Ebrahimiadiba N., Meesea H., Fostera S.,2016.** Long-term side effects of glucocorticoids. Expert opinion on drug Safety, Taylor & Francis. Doi.org/10.1517/14740338.2016.1140743
- **Oyaizu M., 1986.**Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Society of Nutrition and Dietetics*; 44(6):307-315. doi:10.5264/eiyogakuzashi.44.307.
- **Padilla A., Hogan R., Kaiser R.B., 2007.** The toxic triangle: Destructive leaders, susceptible followers, and conducive environments. *The Leadership Quarterly*.;18:176-194
- **Pahwa R., Goyal A., Bansal P., Jialal I., 2020.** Chronic Inflammation. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>
- **Pan M-H., Laia C-S., Ho C-T., 2010.** Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food and function*. 2010, 1, 15–31. Doi: 10.1039/c0fo00103a
- **Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R., 2016.**Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, vol. 5, e47, pp 1-15.Doi:10.1017/jns.
- **Papuc C., Crivineanu M., Goran G., Nicorescu V., Durdun N.,2010.**Free Radicals Scavenging and Antioxidant Activity of European Mistletoe (*Viscum album*) and European Birthwort (*Aristolochia clematidis*). *REV. CHIM.* (Bucharest) 61, Nr.7.
- **Paredes J.D., Sosa Á., Fusco M., Teves M., Wendel G.H., Pelzer L.E., 2016.,** Antidiarrhoeal activity of *Aristolochia argentina* Gris. (Aristolochiaceae) in rodents. *J. Appl.Pharm. Sci* Vol. 6 (02), pp. 146-152. Doi: 10.7324/JAPS.2016.60223.
- **Pereira O.R., Peres A.M., Silva A.M.S., Domingues M.R.M., Cardoso S.M., 2013.** Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC–UV and ESI–MS combined method. *Food Research International* 54 : 1773–1780

- **Pharmacie galénique., 2008.** Les formes pharmaceutiques .Chapitre IV-Tome 1. BP-14S: Pp5/28. Juin 2008.V.3.0
- **Pharmacopée européenne.,2009.** 6^{ème} édition .Edition supplément 6.3 -page 4315, 808-01/2009:0253.
- **Pharmacopée Européenne.,2014.** 8^{ème}édition. Préparations semi-solides pour application cutanée.P 870-872 : s.n., 01/2014.
- **Pharmacie galénique.,2014.** 2^{ème} édition. Formulation et technologie pharmaceutique. Sous la direction de P.Wherlé.Pp195-200.
- **Pharmacopée européenne.,2016.** 9^{ème}édition. Test des germes spécifiques.Examination microbiologique des produits non stériles.P4404-4414.
- **Pollet Ophélie., 2018.** L'ingénierie tissulaire du cartilage .Effet de l'âge du donneur et des contraintes mécanique et chimique du microenvironnement. Thèse de Doctorat. L'universite de Lyon.Pp28.
- **Prasad S., Aggarwal B.B., 2014.** Chronic Diseases Caused by Chronic Inflammation Require Chronic Treatment: Anti-inflammatory Role of Dietary Spices. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 5: 238. Doi:10.4172/2155-9899.1000238.
- **Prats E., Galindo J.C., Bazzalo M.E., León A.,Macías F.A., 2007.**Antifungal activity of a new phenolic compound from *Capitulum* of a head rot-resistant sunflower genotype. *Journal of Chemical Ecology*;33:2245-2253
- **Radideau E., Bah S., Dupont C., Hilliquin P., 2010.** « Polyarthrite rhumatoïde (1^{ère} partie): nouvelles biothérapies ciblant les cellules du système immunitaire, rituximab et abatacept. », *Doss. CNHIM*, vol. XXXI, (4).
- **Rahmani S., Belboukhari N., Sekkoum K. et Cheriti A., 2016.** Evaluation de l'activité anti inflammatoire d'extraits aqueux de feuilles *Limoniastrum feei* (*Plumbaginacea*). *Algerian journal of arid environment*. Vol. 6, n°C1. p. 80-86.
- **Rajaram C., Reddy K. R., Sekhar K. B. C., 2015.** Evaluation of anti-arthritic activity of *Caesalpinia pulcherrima* in freund's complete adjuvant induced arthritic rat model. *Journal of Young Pharmacists* 7 (2), pp128-132.Doi: 10.5530/jyp.2015.2.12.
- **Rashmika P.P, Manish P.P., 2012.** Evaluation of antioxidant activity of *Corchorus aestuans* Linn leaves extracts. *Int Res J Pharm*; 3(7):233-238.
- **Rathee P., Chaudhary H., Rathee S., Rathee D., Kumar V., Kohli K.,2009** Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*; 8, 229-235.

- **Raynaud Jean., 2006.** Prescription et conseil en AROMATHERAPIE. Edition Technique et Documentation.Inter. *Lavoisier*.247pages.Pp13-15.
- **Raza M., Al-Shabanah O. A., El-Hadiyah T. M., Al-Majed A .A., 2002.** Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Sci.Pharm*; 70(2):135-145.; <https://doi.org/10.3797/scipharm.aut-02-16>.
- **Reddy Jitta S., Daram P.,Gourishetti K., Misra C. S., Rao Polu P, et al.,2019.** *Terminalia tomentosa* Bark Ameliorates Inflammation and Arthritis in Carrageenan Induced Inflammatory Model and Freund's Adjuvant-Induced Arthritis Model in Rats. *Journal of Toxicology*. Volume 2019, <https://doi.org/10.1155/2019/7898914>.
- **Robert M.N., 2000.** Progress in the Use of Biochemical and Biological Markers for Evaluation of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 14:305–313.
- **Rodney C., Toni M., Kutchan N., Lewis G., 2000.** Biochemistry and molecular biology of plants.In: Buchanan B, Grissem W, Jones R, editors. Natural Products. Rockville, MD., USA: Wiley; pp. 1253-1348.
- **Romani A., Campo M., Pinelli P., 2012.** HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tanninsfrom different vegetal species. *Food Chemistry* 130 (2012) 214–221
- **Rosalki S.B ., Ying Fee A., Burlina A., Prellwitz W., Stieher P., Neumeier D, et al ., 1993.** Multicenter evaluation of Iso-ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma *Clinical Chemistry*, Vol 39, N° 4, 1993, Pages 648–652, <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.4.648>
- **Ross C., Taylor C. L., Yaktine A.L., Del Valle H.B.,2011.**Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D.*The National acadimies press*.Sciences Engineering Medicine.Books .Chapter: 2. Overview of Calcium. Pages 1-1116. Pp,42-43.
- **Rousselet M .C ., Vignaud J. M., Hofman P., Chatelet F .P., 2005.** Inflammation et pathologie inflammatoire (Chapitre 3). Paris Maloine; 320-331.
- **Rtibi K., Jabri M.A.,Selmi S., Sebai H., Amri M., El-Benna J., Marzouki L., 2016.***Ceratonia siliqua* leaves exert a strong ROS scavenging effect in human neutrophils, inhibit myeloperoxydase in vitro and protect against intestinal fluid and electrolytes secretion in rats. *RSC Adv*. 6, 65483–65493.

- **Rtibi K., Selmi S., Jabri M.A., Mamadou G., Limas-Nzouzi N., Sebai H., El-Benna J., Marzouki L., Eto B., Amri M., 2016.** Effects of aqueous extracts from *Ceratonia siliqua* L. pods on small intestinal motility in rats and jejunal permeability in mice. *RSC Adv.* 6, 44345–44353.
- **Ruffa M.J., Ferraro G., Wagner M.L., M.L. Calcagno., Campos R.H., Cavallaro L, et al., 2002.** Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 79 (2002) 335–339. Doi: 10.1016/S0378-8741(01)00400-7.
- **Sabri F.Z., Belarbi M., Sabri S, Alsayadi Muneer M.S., 2012.** Phytochemical screening and identification of some compounds from Mallow. *Journal of Natural Product and Plant Resources.*; 2(4):512-516.
- **Salazar J., Martínez M. S., Chávez-Castillo Mervin, Núñez V., Añez R, et al., 2014.** C-Reactive Protein: An In-Depth Look into Structure, Function, and Regulation. *International Scholarly Research Notices*, 1–11. Doi:10.1155/2014/653045
- **Salhi S, Fadli M, Zidane L et Douira A., 2010.** Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra (Maroc). *LAZAROA* 31: 133-146. doi:10.5209/rev_LAZA.2010.v31.9
- **Sanchez-Moreno C., Larrauri J. A., Saura-Calixto F., 1998.** A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Science Technology International*. 8, 121-137. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199802\)76:2<270](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2<270)
- **Sannomiya M., Montoro P., Piacente S., Pizza C., Brito A.R. M.S., Vilegas W., 2005.** Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. *Rapid Commun. Mass Spectrom*; 19: 2244–2250
- **Santos A.R.S., De Campos R.O.P., Miguel O.G., Filho V.C, Siani A.C, Yunes R.A, Calixto J.B., 2000.** Antinociceptive properties of extracts of new species of plants of the genus *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 72:229-238.
- **Sanogo R., Konipo A., Maiga A., Arama A.E., Diallo D., Bougoudogo F, et al., 2006.** Formulation d'une pommade dermique à base d'extraits de *Mitracarpus scaber* (ZUCC) *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 2006, Vol. XIV. pp. 159-177.
- **Sany J., 2003.** Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte: conception actuelle. John Libbey Eurotext: 298 p.

- **Schenck P.A., Chew D. J., Nagode L.A., Rosol T.J., 2006.** Chapter 6. Disorders of calcium: hypercalcemia and hypocalcemia. Researchgate, pp 122-194. Doi: 10.1016/B0-72-163949-6/50009-6.
- **Schmitz N., Laverty S., Kraus V.B., Aigner T., 2010.** Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis and Cartilage* 18 (2010) S113-S116.
- **Seiller Monique, Martini Marie Claude., 1996.** Formes pharmaceutiques pour application locale. *Edition Tec et Doc Lavoisier*. p.98, 101-102, 141-142.
- **Sene M., Ndiaye M., Barboza F.S., Diatta W, et al., 2016.** Activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux des feuilles d'*Elaeis guineensis* Jacq. (ARECACEAE) sur l'oedème aigu de la patte de rat induit par la carraghénine. *Int J. Bio.Che.S.* 10(6): 2568-2574, Doi: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v10i6.13>.
- **Shariffara F., Khazaelia P., Alliba N., 2009.** *In Vivo* Evaluation of Anti-inflammatory Activity of Topical Preparations from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) Seeds in a Cream Base *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*: 5(3): 157-162 ijps.sums.ac.ir
- **Shashank K., et Abhay K.P., 2013.** Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview .Hindawi Publishing Corporation. *The Scientific World Journal.*, Article ID 162750, 16 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>.
- **Shen C.L., Yeh J.K., Cao J.J., Wang J.S., 2009.** Green tea and bone metabolism. *Nutr Res*, 29(7):437–456. doi: 10.1016/j.nutres.2009.06.008.
- **Shihabudeen, H.; Mohamed, S.; Priscilla, D.H.; Thirumurugan, K., 2011.** Cinnamon extract inhibits α -glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats. *Nutr. Metabol.*, 8, 46-56.
- **Siby Sidi., 2008.** Etude de la variation des paramètres biochimiques et hématologiques dans le district de Bamako. Thèse de Doctorat. Université de Bamako-Mali. Pp43
- **Side-Larbi K., Meddah B., Belkhodja H., Belmimoun A., Slimani K., Sonnet P., 2017.** Chemical composition and anti-arthritis activity of *Anacyclus valentinus* extract on adjuvant induced arthritis in rats. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, Vol-2, Issue-6. Doi.org/10.22161/ijeab/2.6.31.
- **Simirgiotis M. J., Benites J., Areche C., Sepúlveda B., 2015.,** Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic *Nolana* Species by HPLC-PDA-ESI-MS. *Molecules* 20, 11490-11507; doi:10.3390/molecules200611490.
- **Singleton V.L et Rossi J.A., 1965.** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *A. J. Tech. Vi*, vol.16:pp.144-153.

- **Skrovankova S., Sumczynski D., Mlcek J., Jurikova T., Sochor J., 2015.** Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *Int J Mol Sci*, 16., 24673–24706.
- **Smeriglio A., Barreca D., Bellocco E., Trombetta D., 2017.** Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. *British Journal of Pharmacology*. 174,1 244–1262. DOI:10.1111/bph.13630.
- **Smith, D.B et Jacobson, B.H., 2011.** «Effect of a blend of comfrey root extracts (*Symphytum officinale* L.) and tannic acid creams in the treatment of osteoarthritis of the knee: randomized, placebo-controlled, double-blind, multiclinical trials». *Journal of Chiropractic Medicine.*, 10(3): 147–156. Doi: 10.1016/j.jcm.2011.01.003;
- **Soni H., Patel G., Shah M., Panchal M., Murti K., 2013** Evaluation of anti-arthritic activity of Dazzle ointment - A polyherbal formulation *International Journal of Pharmacology and Clinical Sciences*. Vol.2 Issue 1 14-18
- **Sproston N. R et Ashworth J.J., 2018.** Role of C-Reactive Protein at Sites of inflammation and infection. Vol 9 Article 754 doi: 10.3389/fimmu.2018.00754. *Frontiers in immunology* 1 :11
- **Srinivasa R.J., Prasanthi D., Gourishetti K., Misra C. S., Rao Polu Picheswara, et al., 2019.** *Terminalia tomentosa* Bark Ameliorates Inflammation and Arthritis in Carrageenan Induced Inflammatory Model and Freund's Adjuvant-Induced Arthritis Model in Rats. *Journal of Toxicology*. Vol 2019, Article ID 7898914, 11 pages. <https://doi.org/10.1155/2019/7898914>.
- **Su X.D., Gao Y., Xiang Y.Xin., La P.X and Xing X., 2019.** Chemical composition and biological activities of the Essential Oil from *Aristolochia fordiana* Hemsl. *Rec. Nat. Prod.* 13:4 (2019) 346-354. Doi: <http://doi.org/10.25135/rnp.111.18.09.897>
- **Sunita.V., 2016.** Medicinal plants with anti-inflammatory activity., *The Journal of Phytopharmacology*. 5(4): 157-159.
- **Tag H.M., Kelany., O.E., Tantawy H.M., Fahmy A.A., 2014.** Potential anti inflammatory effect of lemon and hot pepper extracts on adjuvant-induced arthritis in mice. *J. Basic Appl. Zoo.* 67, 149–157.
- **Thirugnanasampandan R., Mahendran and G. Narmatha Bai V., 2008.** Antioxidant properties of some medicinal *Aristolochiaceae* species. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 7 (4), pp. 357-361.

- **Tian-Shung W.U., Yu-Yi C., Yann-Lii L., 2000.** The Constituents of the Root and Stem of *Aristolochia cucurbitifolia* Hayata and Their Biological Activity. *Chem. Pharm. Bull.* 48(7) 1006—1009 (2000) Vol. 48, No. 7. Doi: 10.1248/cpb.48.1006
- **TOÉ S.L., 2004.** Essais de mises au point de formulation de crèmes et laits corporels a base du beurre de karite du Burkina Faso. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université d’Ouagadougou. Pp.12 ,13,19.
- **Tomaz I et Maslov L.,2015.** Simultaneous Determination of Phenolic Compounds in Different Matrices using Phenyl-Hexyl Stationary Phase Food Anal. Methods. Doi 10.1007/s12161-015-0206-7
- **Totoson .H., 2015.** « Dysfonction endothéliale et polyarthrite rhumatoïde :cinétique d’évolution, mécanismes et traitements. Étude chez le rat. » .Thèse de Doctorat en Environnement -Santé .l’Universite de Franche-Comté.Pp .04,11,12,50.
- **Trayee Sarkar D., Latha R., Agastian P., 2016 .**Evaluation of *Aristolochia bracteolata* Linn for antimicrobial activity, α -glucosidase inhibition, and its phytochemical constituents. *Asian J. Phar. Clin Res*, Vol 9, Issue 1, 2016, 102-107.
- **Tseng C.C., Chen Y.J., Chang W.A., Tsai W.C., Ou T.T, et al.,2020.**Dual Role of Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis: The Chicken and the Egg. *Inter. J .Mol Sci*, 21, 1071; doi:10.3390/ijms21031071.
- **Udhaya D.N., Rajasekar M., Venmathi T., 2017.** A review on worm killer: *Aristolochia bracteolata*. *J. Pharmacognosy and Phytochemistry* 2017; 6(2): 06-09.
- **Vagiri M., Ekholm A., Andersson S.C., Johansson E., et Rumpunen K.,2012.** An Optimized Method for Analysis of Phenolic Compounds in Buds, Leaves, and Fruits of Black Currant (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 10501–10510©dx.doi.org/10.1021/jf303398z
- **Valdiguié P., 2000.** *Enzymes plasmatiques*. Dans: Biochimie Clinique.2ème 'Edition. Paris: EMinter : 235-266.
- **Valdiguié P., 2002.**Biochimie Clinique 2e édition. 2eéd. Toulouse; 2002. 356 p.
- **Vallianou, N.G.; Gounari, P.; Skourtis, A.; Panagos, J.; Kazazis, C., 2014.** Honey and its anti-inflammatory, anti-bacterial and anti-oxidant properties. *Gen. Med, (Los Angel)*, 2:2. Doi: 10.4172/2327-5146.1000132.
- **Van Eden W., Holoshitz J., Nevo Z., Frenkel A., Klajman A., et Cohen I. R.,1985.** “Arthritis induced by a T-lymphocyte clone that responds to Mycobacterium tuberculosis and to cartilage proteoglycans,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 15, pp. 5117–5120.

- **Vanessa N., Nunziatina D.T., Nori S.L., Costantinides F., Federico B et Roberto D.L., 2019.** Modulatory Effects of Berton Plant Polyphenols on Bone Remodeling: A Prospective View From the Bench to Bedside. doi: 10.3389/fendo.2019.00494
- **Verma S., 2016.** Medicinal plants with anti-inflammatory activity. *The Journal of Phytopharmacology*; 5(4): 157-159.
- **Visser H., 2005.** Early diagnosis of rheumatoid arthritis, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* Vol. 19, no 1. Pp. 55-72.
- **Waisman A., Liblau R.S., Becher B., 2015.** Innate and adaptive immune responses in the CNS. *Lancet Neurol* 2015; 14: 945–55.
- **Waksman, B. H., 2002.** Immun regulation in adjuvant disease and other arthritis models: relevance to pathogenesis of chronic arthritis. *Scand. J. Immunol.* 56, 12-34.
- **Wang D., Lu J., Miaob A., Xiea Z., Yanga D., 2008.** HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis of polyphenols and purine alkaloids in leaves of 22 tea cultivars in China. *Journal of Food Composition and Analysis.* 21 (2008) 361–369.
- **Wang J; Zhang P; He H., Se X., Sun W, et al., 2017.** Eburicoic acid from *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill attenuates inflammatory responses through inhibiting LPS-induced activation of PI3K/Akt/mTOR/NF-κB pathways in RAW264.7, cells ; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* DOI 10.1007/s00210-017-1382-3.
- **Wu, T.S., Damu, A.G., Su, C.R., and Kuo, P.C., 2005.** Chemical constituents and pharmacology of *Aristolochia* Species, in: Attaur- Rahman, ed., *Studies in natural product chemistry (bioactive natural products)*, Vol. 32, Elsevier, Amsterdam, pp. 855–1018.
- **Yaghoobi, R.; Kazerouni, A.; Kazerouni, O., 2013.** Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory anti-oxidant and anti-viral agent: A review. *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* 8, 100–104.
- **Yougbaré-Ziébro M.N., Ouédraogo N., Lompo M., Bationo H., Yaro B., Gnoula C, et al., 2015.** Activités anti-inflammatoire, analgésique et antioxydante de l'extrait aqueux des tiges feuillées de *Saba senegalensis* Pichon (Apocynaceae). *Phytothérapie*. Doi 10.1007/s10298-015-0992-5.
- **Yuan H., Ma Q., Ye L., Piao G., 2016.** The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*, 21, 559; doi:10.3390/molecules21050559
- **Zaynab M., Fatima, M.; Abbas, S.; Sharif, Y.; Umair, M.; Zafar, M.H.; Bahadar, K., 2018.** Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microb. Pathog.*, 124, 198–202. Doi: 10.1016/j.micpath.2018.08.034.

- **Ziane Laid.,2016** :Etude phytochimique et evaluation biologique des extraits organiques des differentes parties de *limonastriumfeei– blombaginaceae–* (mlefetkhadem).Pp57.
- **Zhang L.I., Wei W., Yan. S., Hu X.Y, Sun W.Y., 2004.** Therapeutic effects of glucosides of *Cheanomeles speciosa* on collagen-induced arthritis in mice. *Acta Pharmacologica Sinica*; 25 (11): 1495-1501.

Annexes

Tableau : Evolution du poids corporel des groupes des rats pendant 42 jours de l'expérimentation

	Témoin	Induit non traité	Placébo	Traité par pommade F1	Traité par pommade F2	Traité par diclofénac
J=1	168,8±3,28	177,7±5,93	181,5±1,59	180,6±4,88	180,8±4,09	179,6±1,87
J=4	176,1 ±4,23	175,8±6,28	176,5±3,62	176,0±5,24	176,7±3,60	177,7±2,14
J=8	182,5±6,39	170,4±5,84	169,9±4,02	172,6±5,27	174,3±4,19	171,6±2,52
J=14	197,9±9,77	164,7±5,39	163,9±3,48	162,5±3,32	171±3,96	165,3±1,92
J=21	204,5±14,05	158,1±4,96	153,3±2,86	165,06±9,52	160,8±3,60	159,7±4,18
J=25	211,1±14,01	163,07±4,00	161,7±3,12	177,2±6,45	169,9±4,20	172,05±4,11
J=29	218,4±13,75	167,3±3,47	167,9±2,57	184,7±7,45	177,9±4,48	183,9±3,37
J=35	224,5±14,34	172,2±2,03	175,6±2,25	192,0±5,03	183,8±3,84	191,2±2,46
J=42	234,7±10,91	177,4±1,56	182,4±2,3	201,0±5,05	191,4±4,77	214,5±2,47

Tableau : Suivi les indices arthritique des groupes des rats pendant 42 jours de l'expérimentation

	Induit non traité	Placébo	Traité par pommade F1	Traité par pommade F2	Traité par diclofénac
J=4	4,66±0,33	3,33±0,33	5,66±0,33	4,33±0,33	5,33±0,33
J=8	6,66±0,33	5,66±0,33	6±0,33	5,66±0,33	6,33±0,33
J=14	6,66±0,33	6,33±0,33	6,33±0,33	6,33±0,33	6,66±0,33
J=21	7±0,33	6,66±0,33	6,33±0,33	6,66±0,33	6,66±0,33
J=25	6,66±0,33	6,33±0,33	4,33±0,33	6,66±0,33	5,33±0,33
J=29	6,66±0,33	6,33±0,33	3,33±0,33	4,66±0,33	3,33±0,33
J=35	6,66±0,33	6,33±0,33	2,33±0,33	3,66±0,33	2,33±0,33
J=42	6,66±0,33	6±0,33	1,33±0,33	2,33±0,33	0,66±0,33

Tableau : Suivi le poids relatif aux organes des groupes des rats pendant 42 jours de l'expérimentation

	Témoin	Induit non traité	Placébo	Traité par pommade F1	Traité par pommade F2	Traité par diclofénac
Foie	3,3±0,57	5.57±0,37	4.25±0,30	3.42±1,97	3.45±0,31	3.49±0,21
Coeur	0.25±0,03	0.3±0,03	0.32±0,01	0.29±0,04	0.3±0,07	0.28±0,01
Reins	0.48±0,02	0.78±0,07	0.72±0,07	0.54±0,01	0.6±0,09	0.5±0,04
Poumons	0.49±0,04	0.53±0,05	0.5±0,08	0.5±0,02	0.57±0,03	0.55±0,01

Tableau : Suivi le poids relatif de la rate et du thymus des groupes des rats pendant 42 jours de l'expérimentation

	Témoin	Induit non traité	Placébo	Traité par pommade F1	Traité par pommade F2	Traité par diclofénac
Indice de rate	2,81±0,05	3,4±0,03	3,18±0,18	2,83±0,03	3,08±0,17	2,75±0,89
Indice de thymus	0,85±0,004	1,79±0,06	1,45±0,04	0,87±0,04	1,35±0,10	0,8±0,06

1-Etude statistique de l'activité antioxydante

• Test de DPPH

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des Variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre les groupes	0,000096	1	0,000096	6,063158	0,069516	7,708647
A l'intérieur des groupes	6,33E-05	4	1,58E-05			
Total	0,000159	5				

• Test de FRAP

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des Variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre les groupes	0,004108	1	0,004108	43,62655	0,002723	7,708647
A l'intérieur des groupes	0,000377	4	9,42E-05			
Total	0,004485	5				

2-Analyse statistique de l'étude *in vivo*

• Evolution du poids corporel de rats témoins, induits non traités et induits traités

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	2628,53728	1	2628,53728	13,7344469	0,00047211	4,00687282
A l'intérieur des groupes	11100,204	58	191,382828			
Total	13728,7413	59				

• Evolution de l'œdème des rats induits non traités et les rats induits traités

ANALYSE DE VARIANCE						
Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	206,31049	1	206,3104898	57,6708182	1,28351E-11	3,93069167
A l'intérieur des groupes	379,202387	106	3,57738101			
Total	585,512877	107				

- **Protéine Réactive C (CRP)**

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	504,533008	1	504,533008	6053,79072	3,00385E-15	4,964602701
A l'intérieur des groupes	0,83341667	10	0,08334167			
Total	505,366425	11				

- **Facteur rhumatoïde (FR)**

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	10,6666667	1	10,6666667	1	0,37390097	7,70864742
A l'intérieur des groupes	42,6666667	4	10,6666667			
Total	53,3333333	5				

- **Indice arthritique**

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	96	1	96	45,1576314	1,38619E-09	3,94230315
A l'intérieur des groupes	199,833333	94	2,12588652			
Total	295,833333	95				

- **Calcémie**

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	0,45240833	1	0,45240833	19,8700681	0,001220694	4,9646027
A l'intérieur des groupes	0,22768333	10	0,02276833			
Total	0,68009167	11				

- **Phosphatase alcaline sérique (PAL)**

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	261,1467	1	261,1467	17964,68929	1,31188E-17	4,964602701
A l'intérieur des groupes	0,14536667	10	0,01453667			
Total	261,292067	11				

- **Aspartate aminotransferase (ASAT)**

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	3,3333E-05	1	3,3333E-05	0,00370233	0,952680121	4,9646027
A l'intérieur des groupes	0,09003333	10	0,00900333			
Total	0,09006667	11				

- **Alanine aminotransferase (ALAT)**

ANALYSE DE VARIANCE

Source des variations	Somme des carrés	Degré de liberté	Moyenne des carrés	F	Probabilité	Valeur critique pour F
Entre Groupes	1026,93501	1	1026,93501	7812,461233	8,40649E-16	4,9646027
A l'intérieur des groupes	1,31448333	10	0,13144833			
Total	1028,24949	11				

Les protocoles de dosage des marqueurs biochimiques

Dosage de la CRP (kit SPINREACT)

- Lame pour agglutination réutilisable et pipettes à usage unique
- **Réactif R1** « CRP-Latex » : Suspension de particules de polystyrène recouvertes d'anticorps anti-CRP (origine chèvre), il est standardisé pour détecter des taux de CRP dans le sérum aux environs de 6mg/l(seuil de sensibilité)
- **Réactif R2** « Contrôle Positif » : Sérum humain contenant de la CRP
- **Réactif R3** « Contrôle Négatif » : Sérum humain exempt de CRP

Les réactifs sont stockés à 2-8°C et à l'abri de la lumière

Méthode de dosage

Test qualitatif

Sur une lame déposer :

- 1goutte (50 µl) du contrôle négatif
- 1 goutte (50 µl) du contrôle positif
- 1 goutte (50 µl) du sérum à tester
- Ajouter une goutte de Réactif Latex (50 µl) à coté de chacune des gouttes de contrôles et sérum.
- Mélanger à l'aide d'une pipette les 2 gouttes et les repartir sur la totalité de la lame.
- Appliquer sur la lame un mouvement de rotation pendant 2 minutes et observer l'agglutination

La présence ou l'absence d'agglutination visible indique la présence ou l'absence de CRP dans le sérum.

Test semi qualitatif

- Préparer des dilutions dans des tubes à essais en solution de NaCl 9g/l.
- Répéter le test pour chaque dilution en utilisant les mêmes réactifs que le test qualitatif
- Déterminer la dernière dilution qui donne encore une agglutination. Le titre est exprimé comme étant la réciproque de la plus haute dilution conduisant à une agglutination. La concentration de sérum en CRP est estimée par la multiplication du titre obtenu par le seuil de sensibilité du test (6mg/l).

Dosage du Facteur rhumatoïde :

-Cartes tests

-Bâtonnets jetables « Agitateurs »

Réactifs

Réactif A.: suspension de particules de latex sensibilisées avec gammaglobuline humaine ,azide de sodium 0.95 g/l, tampon glycine 100mmol/l, pH 8.2

Réactif C-.Contrôle négatif : Sérum contenant moins de 30UI/ml, **Réactif C+**.Contrôle Positif : Sérum humain contenant plus de 30UI/ml.

Le réactif et les contrôles sont conservés à 2-8°C

Méthode de dosage

-Placer les réactifs et les échantillons à température ambiante

- déposer 50 µl de l'échantillon à tester et une goutte de chaque contrôle dans la carte test

-Homogénéiser doucement et ajouter une goutte du réactif(A) à coté de l'échantillon à analyser

-Mélanger à l'aide d'un agitateur en étalant le mélange sur toute la surface de la carte

-Agiter la carte pendant 2 minutes.

Lecture

Résultat négatif : l'absence d'agglutination indique un contenu en FR inférieur à 30UI/ml (<30UI/ml).

Résultat positif : la présence d'agglutination indique un contenu en FR \geq 30UI/ml. Pour déterminer la concentration de sérum en FR , faire une série des dilutions en NaCl 9g/L. Le titre d'un sérum est défini comme étant la plus grande dilution donnant un résultat positif. Le taux approximatif d'un sérum en FR est obtenu en multipliant le titre par 8UI/ml.

Il faut noter que la dilution du sérum dans une solution saline entraîne un changement de la sensibilité du test de 30UI/ml à 8UI/ml du à un effet fort de la matrice de l'échantillon sur l'agglutination du latex.

Dosage du Calcium (kit de Biomaghreb)

Réactifs

Réactif 1 : Solution tampon, **Réactif 2** : Solution chromogène, **Réactif 3** : Standard

Solution de travail

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

-Stabilité : 4heures à 20-25°C

20heures à 2-8°C

Méthode de dosage

	Blanc	Standard	Echantillon
Standard (µl)	-	20	-
Echantillon (µl)	-	-	20
Mélange réactif (ml)	1	1	1

Mélanger et incuber 5 minutes à température ambiante. Lire les densités optiques à 570nm.

-La coloration est stable 1heure.

Calcul : DO échantillon /DO standard x10=mg/dl de Calcium

Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

Réactifs

Réactif 1 : tampon (Diethanolamine DEA+ Magnésium chloride) ;

Réactif 2 : pNitrophenolphosphatepNPP).

Solution de travail :

Faire dissoudre 2ml du réactif 2 dans le tampon (réactif 1) et mélanger soigneusement

La solution de travail est stable 2 semaines de 2 à 8°C et 5 jours de 15 à 25°C. La solution de travail doit être stockées à l'abri de la lumière.

Méthode de dosage :

Solution de travail (ml) :1.2

Sérum (µl) :20

Mélanger et incuber pendant 1 minute .Lire l'absorbance à 504 nm après 1,2 et 3 minutes.

Calculer la moyenne des absorbances par minute ($\Delta A/\text{min}$).

Calcul: $\Delta DO/\text{min} \times 3300 \text{ UI/L d'ALP}$

Dosage d'Aspartate Amino Transférase (ASAT) ou Transaminase Glutamo-oxaloacétique (TGO) (Kit de SPINREACT) :

Réactifs :

Réactif 1 : Tampon (Tampon TRIS, L-aspartame ; LDH ; azide de sodium), pH 7.9.

Réactif 2 : Substrat (NADH, Azide de sodium, 2-Oxoglutarate)

Solution de travail :

Faire dissoudre 2ml du réactif 2 dans le tampon (réactif 1) et mélanger soigneusement

La solution de travail est stable 4 semaines de 2 à 8°C et 5 jours de 15 à 25°C. La solution de travail doit être stockée à l'abri de la lumière.

Méthode de dosage :

Solution de travail : 1(ml)

Sérum : 100(µl)

Mélanger et incuber pendant 1 minute .Lire l'absorbance à 340 nm après 1,2 et 3 minutes.

Calculer la moyenne des absorbances par minute ($\Delta A/\text{min}$).

Calcul : $\Delta DO/\text{min} \times 1750 \text{ UI/L d'ASAT (TGO)}$

Dosage d'Alanine Amino Transférase (ALAT) ou Transaminase glutamopyruvique (TGP) :

Réactifs :

Réactif 1 : tampon (Tampon TRIS, L-alanine ; LDH ; azide de sodium), pH 7.4

Réactif 2 : substrat (NADH, Azide de sodium, 2-Oxoglutarate)

Solution de travail :

Faire dissoudre 2ml du réactif 2 dans le tampon (réactif 1) et mélanger soigneusement

La solution de travail est stable 4 semaines de 2 à 8°C et 5 jours de 15 à 25°C. La solution de travail doit être stockée à l'abri de la lumière.

Méthode de dosage :

Solution de travail : 1(ml)

Sérum 100 (µl)

Mélanger et incuber pendant 1 minute .Lire l'absorbance à 340 nm après 1,2 et 3 minutes.

Calculer la moyenne des absorbances par minute ($\Delta A/\text{min}$).

Réactif 1 : tampon L-Alanine ; **Réactif 2 :** NADH, LDH, α - Ketoglutarate.

TGP : Transaminase Glutamo-Pyruvique

LDH : Lactate déshydrogénase

Calcul: $\Delta DO/\text{min} \times 1750 \text{ UI/L d'ALAT (TGP)}$

Milieux de culture**1/Tampon peptoné au chlorure de sodium pH 7 (TSE) :(g/l)**

Peptone de caséine	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate de sodium, dibasique	9,0 g
Phosphate de potassium, dibasique	1,5g
Phosphate de sodium, 12H ₂ O	10 g
Thiosulfate de sodium, 5H ₂ O	0,8 g
Lécithine	0,3 g
L-Histidine,HCl	0,1 g
Tween® 80	3 g

pH = 7**2/ Bouillon tryptone caséine - soja (TSB) : (g/l)**

Peptone (origine non animale)	20 g
Glucose	2.5g
Chlorure de sodium (NaCl)	5g
Phosphate bipotassique d'hydrogène(K ₂ HPO ₄)	2.5g

pH = 7,3**3/Gélose tryptone soja(TSA) :(g/l)**

Peptone peptique de soja	5g
Tryptone	15 g
Chlorure de sodium	5g
Agar	5g

pH = 7,3**4/ Milieu gélosé-cétrimide :(g/l)**

Peptone	20 g
sucre	10 g
sels biliaries n° 3	1,5 g
rouge neutre	0,05 g
chlorure de sodium	5 g
Agar-agar	15 g

pH = 7,1

5/Gélose Chapman : (g/l)

Peptone	10 g
Extrait de viande de bœuf	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol	10 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar-agar	15 g

pH = 7,4**6/Gélose Sabouraud SG 4% :(g/l)**

Peptones	10,0 g
Glucose	40,0 g
Agar	15,0 g

pH = 5,6

1-Test d'irritation cutanée

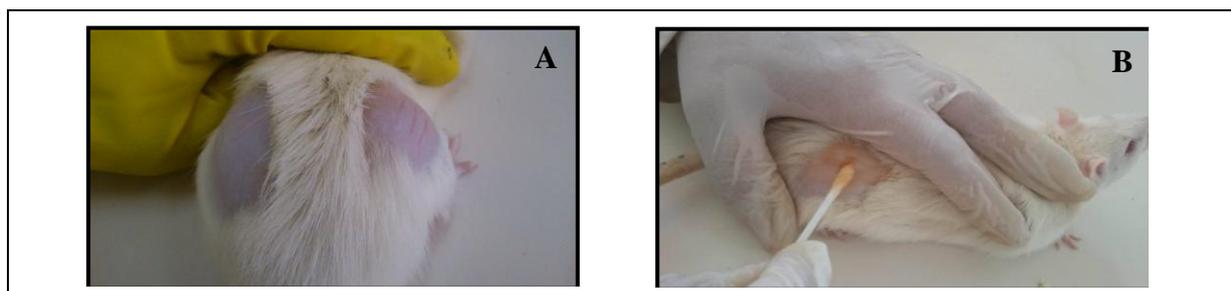


Fig. Préparation de la zone scarifiée et non scarifiée **A** ; Application de la pommade **B**.

2-Etude de l'effet des formulations sur l'arthrite rhumatoïde

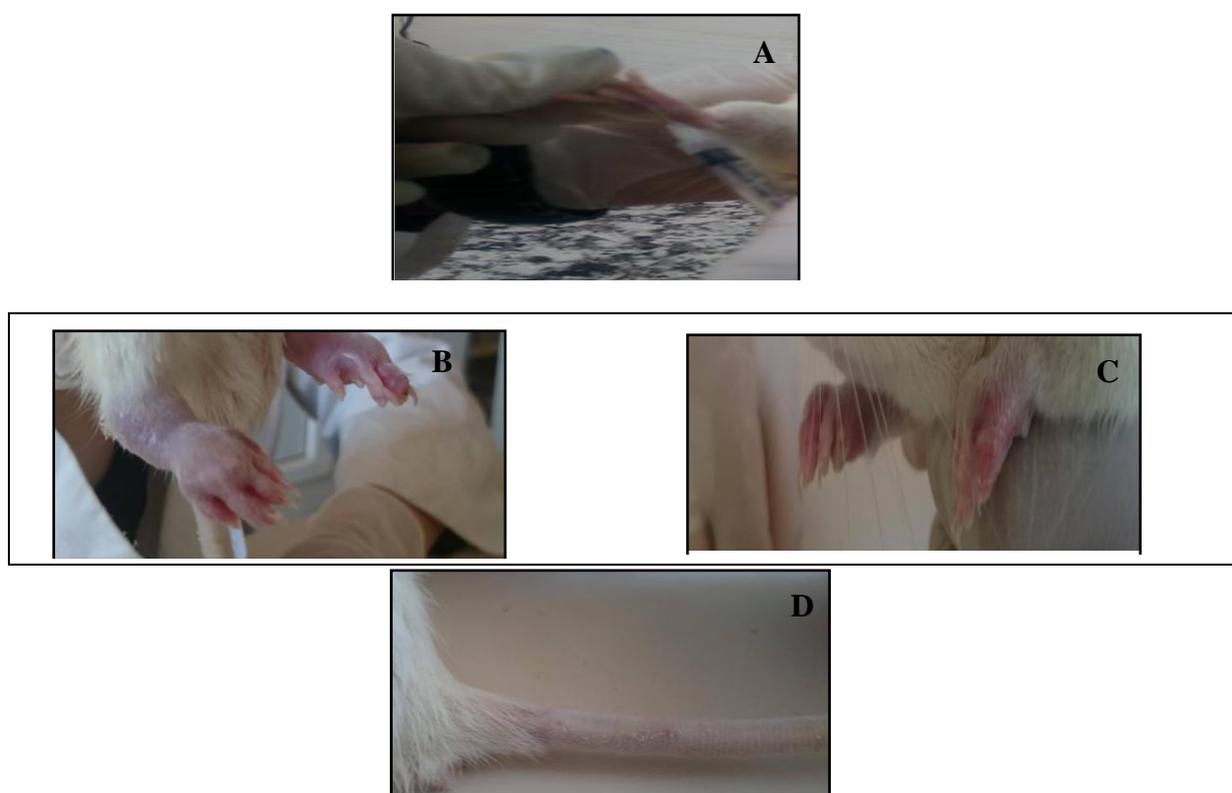


Fig. Induction de l'arthrite rhumatoïde **A** ; Inflammation des pattes postérieurs **B** ; Inflammation des pattes antérieurs **C** ; Présence des nodules au niveau de la queue **D**



Fig. Avant l'application du traitement

Fig. Après l'application du traitement par les pommades F1 et F2



Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Algerian *Aristolochia longa* Flavonoids

Soumia Attou^{1*}, Boumediene Meddah¹, Aicha Tir Touil Meddah¹, Meriem Mokhtar², Pascal Sonnet³

¹Laboratory of Research, Bioconversion, Engineering Microbiology and Health Safety, Faculty of SNV, University Mustapha Stambouli of Mascara, Algeria

²Laboratory of Beneficial Microorganisms Functional Food and Health, Faculty of Life and Natural Science, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria

³AGIR: Infectious Agents, Resistance and Chemotherapy, UFR of Pharmacy, University of Jule Vernes, Amiens, France

Corresponding Author: Soumia Attou, PhD, Laboratory of Bioconversion, Engineering Microbiology and Health Safety, Faculty of Sciences of Nature and Life, University Mustapha Stambouli of Mascara, Algeria. Tel: +213-55322688, Email: soumia.attou@univ-mascara.dz

Received September 19, 2019; Accepted November 30, 2019; Online Published July 5, 2020

Abstract

Introduction: *Aristolochia longa*, is widely used as medicinal plant, in the Algerian folk medicine since ancient times and passed through the generations. This study was focuses on the qualitative examination of different phytochemical constituents to determine their antioxidant activities. **Materials and Methods:** Leaves and roots were extracted by liquid/liquid extraction technique using the methanol as solvent. The total phenolic and flavonoids content were determined by Folin–Ciocalteu and AlCl₃ methods respectively. The antioxidant activity was evaluated with two distinct methods: DPPH radical scavenging assay and ferric reducing antioxidant power test (FRAP). Then, the high performance liquid chromatography (HPLC) method was performed to analyse leaves and roots n-butanol fractions.

Results: Leaves gave significant value of polyphenols (8.580 ± 0.04 mg GAE/g DW). Whereas, n-butanol fraction flavonoids extracted from leaves was observed widely highest in Leaves of *Aristolochia longa* (4.54±1.94 mg CE/g DW). N-butanol fraction leaves showed a powerful scavenging activity and reducing activity with an IC₅₀=0.044±0.001 mg/mL and EC₅₀=0.126±0.041 mg/mL respectively. The HPLC analysis of leaves and roots n-butanol fraction revealed different bioactive compounds which they belong to the flavonoids category.

Conclusions: The results obtained from this study suggest that *A. longa* leaves were considered as an important resource of flavonoids, which have an interesting antioxidant power.

Keywords: *Aristolochia longa*, Flavonoids, Antioxidant Activity, HPLC, Algerian West Region

Citation: Attou S, Meddah B, Touil Meddah AT, Mokhtar M, Sonnet P. Phytochemical screening and antioxidant activity of Algerian *Aristolochia longa* flavonoids. J Appl Biotechnol Rep. 2020;7(3):166-171. doi:10.30491/JABR.2020.109897.

Introduction

The *Aristolochia* species belongs to the *Aristolochiaceae* family, which has up to 500 species.¹ They exhibit an interesting biological properties, e.g. antibacterial, oncological, anti-allergic, a anti-inflammatory, anti-plasmodial, muscle relaxant carcinogen inactivation, anti-proliferation, and stimulation of apoptosis mechanisms.²⁻⁵ The *Aristolochia* genus contain aristolochic acids with is characterized by chronic renal failure.⁶ On the other hand, various studies have shown that they have large amounts of secondary metabolites.⁷ The *Aristolochia longa* belongs to the genus *Aristolochia* and it is famed as “berrostom” in the Algerian population. Flavonoids present a large group of polyphenols, which normally present in plant tissues with a proportionately concentrations. Their contents in plants depends on many factors such as cultivar, weather, geographical localization, daylight, soil conditions, temperature, water stress, harvesting time.⁸ There

is a group of about 400 natural polyphenolic compounds located widely in plant.⁹ Flavonoids are classified into many subgroups containing the following: flavone, flavanone, flavonol, isoflavonoid, anthocyanin, and chalcones.⁹ They are considered as natural antioxidant drugs compounds, and they also are able to scavenge free radicals, reactive oxygen species and inhibit lipid peroxidation.⁹ In addition, their antioxidant activity depends strongly on the number and position of hydrogen of the molecule.⁹ In this study deals with, the determination secondary metabolites of *A. longa*. Then, the antioxidant activity of flavonoids fractions was estimated in order to find new bioactive natural products in different parts which were leaves and roots.

Materials and Methods

Collection and Preparation of Plant Material

Aristolochia longa leaves and roots were collected in Mach

2015 in Ouled Ali region located in Tissemsilt city (Algeria). The plant was deposited in the Nature and Life Science Faculty, University of Mascara, Algeria, as a voucher specimen (ARI0001). The leaves and roots were dried, reduced to powder and then stored in closed container away from heat, air and light until moment of use.

Phytochemical Screening

Flavonoids, alkaloids, glycosides, steroids, saponins, coumarins, terpenoids and anthraquinones were subjected to a phytochemical screening using standard procedures according to the methods described by.¹⁰⁻¹²

Extraction of Flavonoids

Ten grams of plant powder (leaves and roots) was macerated in 100 mL of pure methanol for 24 hours for three times. The mixture was filtrated through Whatman n°2. Then, the methanol was removed using rotary evaporator at 60°C. The obtained dry residue was treated with 50 mL of warm water for the purpose of obtaining an aqueous extract. The aqueous extract was subjected to a series of liquid-liquid extraction. This operation allows the separation of one or more constituents by the use of their unequal distribution in two substantially immiscible liquids. It consists in the addition of 3 × 30 mL of chloroform, which eliminates chlorophyll (leaves) and lipids (roots). Then diethyl ether was added to extract the free aglycones and flavonoids. Finally, the addition ethyl acetate allows to eliminate the monosids and the majority of flavone glycosides. After each phase, the aqueous phase was recovered. At the end, n-butanol was added to recover the alcoholic phase. All the obtained fractions were evaporated and dried.¹³

Extraction Yield

The extraction yield was calculated according to the formula:

$$R\% = Pe/Pp \times 100$$

R: Yield

Pe: weight of the extract

Pp: weight of the plant

Determination of Total Phenolic Content

The total phenolic content of the extracts was determined by using the method of Folin-Ciocalteu.^{14,15} A sample of 200 µL of the extract was mixed with 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (10%) and 0.8 mL of 7.5% sodium carbonate (Na₂CO₃). The mixture was incubated at room temperature for 30 minutes. Then, the absorbance was determined at 765 nm using a spectrophotometer (UV mini-1240-vis -SHIMADZU). The calibration curve was prepared using gallic acid as standard. The results are expressed in milligrams equivalent of gallic acid per gram of dry extract (± SD for tree replications).

Determination of Flavonoids Content

The quantitative determination of flavonoids was calculated by spectrophotometric assay according to the method described by.¹⁶ A sample of 500 µL of the extract was combined with 1500 µL of distilled water. Then, 150 µL of a 5% NaNO₂

solution was added. After 5 minutes, 150 µL of AlCl₃ (10%) was added. The solution was homogenized and 500 µL of NaOH was added. The absorbance was determined at 510 nm, using a UV mini-1240-vis -SHIMADZU. The flavonoids content was expressed in milligrams catechin equivalents (CE)/g of dry extract.

DPPH Radical Scavenging Assay

The antioxidant capacity was determined with DPPH method.¹⁶ A volume of 1.95 mL of DPPH methanolic solution (0.025 g/mL) was added to 50µL of the extracts with different concentrations (from 0.0125 to 5 mg/mL). After 30 minutes in darkness, the absorbance was determined against a blank (extract was replaced with methanol) at 515 nm. Ascorbic acid was used as a standard. IC50 values were determined graphically by linear curve.

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

This test was conducted according to the method of¹⁷ 2.5 mL of phosphate buffer solution 0.2 M (pH 6.6) and 2.5 mL of a potassium ferricyanide K₃Fe (CN)₆ at 1% were added to 500 µL of the extract with different concentrations (0.007 to 2.5 mg/mL). After 20 minutes and at 50°C, the composite was incubated in a water bath. A volume of 2.5 mL of trichloroacetic acid (10%) was added. for 10 minutes, the mixture was centrifuged at 3000 rpm. The supernatant (2.5 mL) was combined with distilled water (2.5 mL) and 500 µL of ferric chloride (0.1%). The absorbance was measured at 700 nm.

Identification of Leaves and Roots Polyphenols and Flavonoids by HPLC-DAD-ESI-MS

The identification of *A. longa* leaves and roots polyphenols and flavonoids was conducted on a Shimadzu-system (prominence I. LC-2030C 3D) equipped with a surveyor UV-VIS diode array detection (DAD) and a LCQ advantage max ion trap mass spectrometer (all from Thermo fisher scientific, Waltham, MA, USA), coupled through an electrospray ionization (ESI) source. The separation was performed on ascentis express C18 column (15 cm x 4.6 mm) ID packed with 2.7 µm partially porous particles (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The binary mobile phase consisted of water/acetic acid: 0.075% (solvent A) and methanol/acetic acid: 0.075% (solvent B). The gradient was 0-5 minutes: 2% of B, 5-80 minutes: 2%-100% of B, 80-85 minutes: 100%. The flow rate was 0.8 mL/min and the injection volume was 5 µL.

PDA wavelength range was 190–400 nm and the chromatograms were extracted at 280 nm (time constant: 0.025 s; sample frequency: 40 Hz). MS acquisition was performed using an ESI interface, in the negative ion mode, under the following conditions: mass spectral range 100–800 m/z; interval: 0.5 s; scan speed: 1500 amu/s; nebulizing gas (N₂) flow: 1.5 L/min; interface temperature: 350°C, heat block: 300°C; desolvation line temperature: 300°C; DL voltage: –34 V; interface voltage: –4.5 kV; Q array DC voltage: 1.0 V; Q array radio frequency voltage: 60 V.

The quantitative of each compound was carried out by the external standard method in a concentration range of 1–100

ppm. The results were obtained from the average of three determinations and are expressed as microgram per gram dried extract \pm %RSD.

Statistical Analysis

All antioxidant activities data of several parts were done in replicate. The results were expressed as mean values \pm standard deviation (SD). The means were compared by using the one-way analysis of variance (ANOVA). The differences between individual means were deemed to be significant at $P < 0.05$.

Results

Phytochemical Screening

Flavonoids, tannins, coumarins, saponins, alkaloids and steroids were found in leaves and roots of *A. longa* powder. The result was presented in Table 1.

Extraction Yields

As shown in (Figure 1). Methanolic extract leaves yield was found equal to (12.58%) which is highest than the roots yield with a percentage of 9.05%. In addition, the n-butanol leaves gave the highest yield compared to the other fractions (6.5%).

Total Phenolic Content, Flavonoids Content of *Aristolochia longa*

The evaluation of total phenolic compounds was determined by using the Folin-Ciocalteu reagent, which forms blue complexes in the presence of reducing agent.¹⁸ The total

phenolic contents in the different extracts were expressed with gallic acid equivalents using the standard curve equation $y=1.216x+0.0054$, $r^2=0.988$. The results showing in Figure 2A revealed that the leaves and roots of *A. longa* contain 8.58 mg GAE/g DW and 8.18 GAE/g DW of total phenolic respectively.

The flavonoids are known by their action to make the yellow or red/blue pigmentations in flowers and provide protection against microorganisms and insects attack.¹⁹ The flavonoids contents (mg/mL) in different fractions of *A. longa* were determined using the standard curve for catechin with the equation $y=1.8x+0.211$, $r^2=0.983$.²⁰ The flavonoids content is highest in leaves methanolic extracts (8.011 mg CE/g DW) than the roots (5.423 mg CE/g DW) (Figure 2B). Table 2 shows the flavonoids contents in various fractions. N-butanol fraction of leaves and roots have the highest flavonoids content (4.54 ± 1.94 and 1.37 ± 0.42 mg CE/g DW, respectively).

Antioxidant Activity Essay

In this study, the antioxidant activity was accessed with two assays, DPPH scavenging activity and FRAP. Scavenging of DPPH free radical determines the potential of the test sample, which shows its effectiveness, prevention, interception and repair mechanism against injury in a biological system.²¹ DPPH assay allows estimation of hydrogen radical donating ability of the extract.²² The blue color DPPH radical present a strong absorbance at 517 nm, which reduce as the color

Table 1. Phytochemical Constituents of the *Aristolochia longa*

Secondary Metabolites	Leaves	Roots
Coumarins	+++	+++
Terpenoids	-	-
Alkaloids	-	-
Saponins	+++	+
Steroids	+++	-
Tannins	+	++
Flavonoids	+++	+

+: Presence; ++Strongly presence; -: Absence

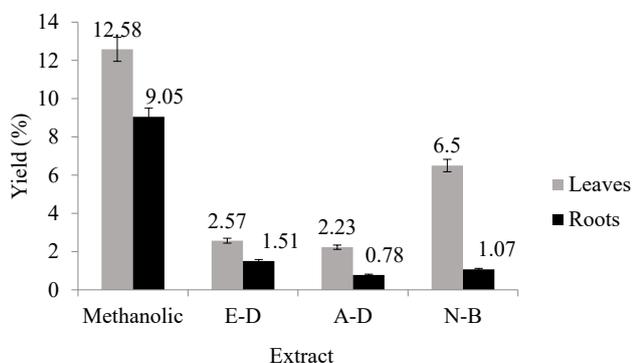


Figure 1. Yield of *Aristolochia longa*. E-D: Diethyl ether fraction; A-D: Ethyl acetate fraction; N-B: N-butanol fraction. Values are expressed as the mean value standard deviation (n=3).

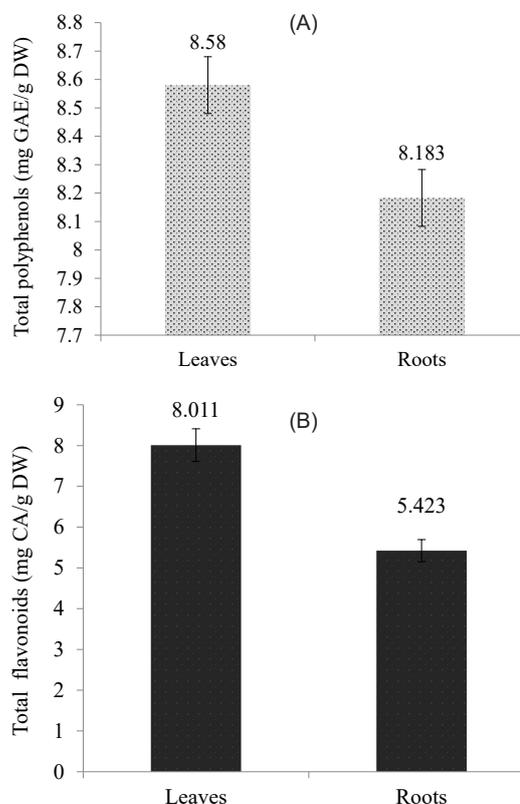


Figure 2. Total polyphenols content (A) expressed on (mg GAE/g DW) and total flavonoids content (B) of methanolic extract of *Aristolochia longa* expressed on (mg CE/g DW). Values are expressed as the mean value standard deviation (n=3).

Table 2. Fractions flavonoids content of *Aristolochia longa* expressed on (mg CE/g DW)

	Flavonoids (mg CE/g DW)		
	E.D	A-D	N-B
Leaves	1.18±0.02	3.05±0.22	4.54±1.94
Roots	0.85±1.47	1.45±1.31	2.87±0.42

E-D: Diethyl ether fraction; A-D: Ethyl acetate fraction; N-B : n-butanol fraction. The values are expressed are means ± SD.

changes.²³ The free radical-scavenging activity was expressed as the IC₅₀ values (Table 3). The IC₅₀ values of the antioxidant capacity varied significantly ($P < 0.05$) from 3.82 ± 0.93 mg/mL to 0.096 ± 0.007 mg/mL in comparison with Ascorbic acid (0.02 mg/mL). However the antioxidant activity (IC₅₀= 0.044 ± 0.001 mg/mL) of leaves n-butanol fraction was found non-significant ($P > 0.05$). On the other hand, the antioxidant ability (0.096 ± 0.007 mg/mL) of root n-butanol fraction was found significant ($P < 0.05$).

The FRAP assay of extracts fractions was determined by the ferric reducing ability. The presence of reducers (antioxidants) causes the transformation of the F³⁺/ferricyanide complex used in this method to the ferrous form and formation of blue complex, also the reducing power can be determined by measuring the complex at 700 nm. In addition a higher absorbance indicates a higher reducing power.²⁴ The reducing power of *A. longa* increased with the increase of different fractions concentration and varied significantly ($P < 0.05$) from (0.40 ± 0.085 mg/mL to 3.00 ± 0.10 mg/mL) (Table 3). The results of this research revealed that the reducing power of leaves n-butanol fraction (EC₅₀= 0.126 ± 0.041 mg/mL) was no significant ($P > 0.05$) in comparison with ascorbic acid (EC₅₀= 0.051 ± 0.009 mg/mL).

Identification of Polyphenols and Flavonoids by HPLC-DAD-ESI-MS

The phenolic composition of *A. longa* leaves and root was accomplished by HPLC-DAD-ESI-MS. The chromatograms are presented in Figure 3 and Figure 4. A total of 12 compounds were identified in the n-butanol leaves fraction, 4 phenolic acids (quinin acid, protocatechuic acid hexoside, 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid and 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid) and eight flavonoids (caffeoylhexoside, kaempferol-3-O-rutinoside, naringenin-O-glucoside, apigenin-8-C-hexoside, kaempferol-3-O-glucoside, apigenin-7-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-diglucoside and apigenin 6,8-di-C-glucoside). Apigenin-8-C-hexoside was the major identified compounds (57.73%) followed by kaempferol-3-O-glucoside (26.67%), protocatechuic acid hexoside (3.73 %) and the 3, 5-Di-O-caffeoylquinic acid 3.60%) (Table 4). The phenolic profile of the n-butanol fraction of roots extract was less important than the leaves, only nine compounds were identified. The protocatechuic acid hexoside was the major polyphenol in the *A. longa* roots (37.49 %) followed by 3, 5-Di-O-caffeoylquinic acid (15.65%), kaempferol-3-O-glucoside (15.04%) and apigenin-7-O-glucoside (9.87%). The following flavonoids: kaempferol-3-O-rutinoside, isorhamnetin-3-O-

Table 3. DPPH Scavenging Activity (IC₅₀ Values) and Reducing Power (EC₅₀ Values) of *Aristolochia longa* Leaves and Roots Fractions

Fractions	Scavenging Activity IC ₅₀ (mg/mL)	Ferric Reducing Power Activity EC ₅₀ (mg/mL)
Leaves diethyl ether fraction	1.59±0.09***	1.42±0.03***
Leaves ethyle acetate fraction	0.137±0.001***	0.40±0.085**
Leaves n-butanol fraction	0.044±0.001 ^{ns}	0.126±0.041 ^{ns}
Roots diethyl ether fraction	3.82±0.93***	3.00±0.10***
Roots ethyle acetate fraction	2.04±0.5***	1.769±0.4**
Roots n-butanol fraction	0.096±0.007**	0.54±0.24*
Ascorbic acid	0.002±0.0002	0.051±0.009

IC₅₀ values are expressed are means ± SD and the IC₅₀, EC₅₀ of the deference fractions were provided in terms of mg/mL. Comparison was realized against ascorbic acid, ns: non significance, * $P < 0.05$ significant difference, ** $P < 0.01$ very significant difference, *** $P < 0.001$ extremely significant difference.

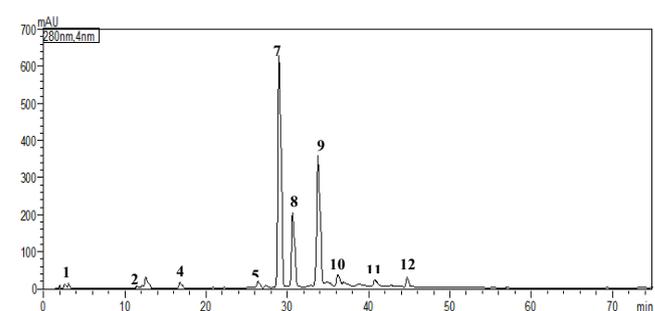


Figure 3. Identification of Polyphenols and Flavonoids From the n-Butanol Fraction of *Aristolochia longa* Leaves by HPLC-DAD-ESI-MS. **1:** Caffeoyl hexoside, **2:** Quinin acid, **3:** Protocatechuic acid hexoside, **4:** 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid, **5:** Kaempferol-3-O-rutinoside, **6:** Naringenin-O-glucoside, **7:** Apigenin-8-C-hexoside, **8:** Kaempferol-3-O-glucoside, **9:** Apigenin-7-O-glucoside, **10:** 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid, **11:** Isorhamnetin-3-O-diglucoside, **12:** Apigenin 6,8-di-C-glucoside

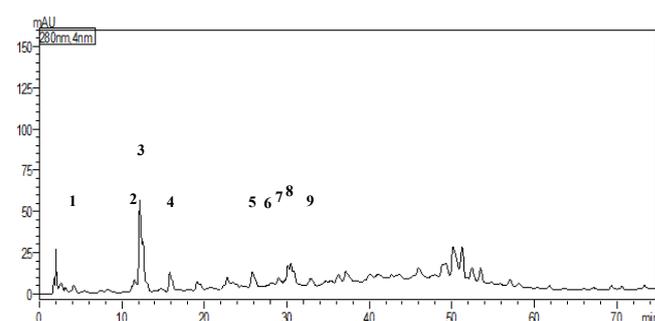


Figure 4. Identification of Polyphenols and Flavonoids From the n-Butanol Fraction of *Aristolochia longa* Roots by HPLC-DAD-ESI-MS. **1:** Caffeoyl hexoside, **2:** Quinin acid, **3:** Protocatechuic acid hexoside, **4:** 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid, **5:** Naringenin-O-glucoside, **6:** Apigenin-8-C-hexoside, **7:** Kaempferol-3-O-glucoside, **8:** Apigenin-7-O-glucoside, **9:** 3,5-Di-O-caffeoylquinic acid.

diglucoside, and Apigenin 6, 8-Di-C-glucoside were absent in the roots (Table 4).

Discussion

The present study reveals the antioxidant activity of flavonoids extracted from *A. longa*. The phytochemical analysis proved the

Table 4. Polyphenols and Flavonoids of the n-Butanol Fraction of *Aristolochia longa* Leaves and Roots

Peak	Retention Times	λ max	MH-	Leaves ($\mu\text{g/g DM}$)	Root ($\mu\text{g/g DM}$)	Compound
01	3.094	195-261	341	37.89	13.30	Caffeoylhexoside
02	11.712	260	197	31.42	39.11	Quinicacid
03	12.78	217-277	315	235.15	152.41	Protocatechuicacidhexoside
04	16.77	266-330	353	93.83	3.04	3,5-Di-O-caffeoylquinic acid
05	26.37	268-348	593	139.30	-	Kaempferol-3-O-rutinoside
06	27.32	271-332	271	101.58	2.83	Naringenin-O-glucoside
07	28.84	270-336	431	3574.49	40.14	Apigenin-8-C-hexoside
08	30.88	268-349	447	1651.82	61.15	Kaempferol-3-O-glucoside
09	34.012	270-337	431	15.08	33.90	Apigenin-7-O-glucoside
10	36.38	273-327	515	223.09	63.61	3,5-Di-O-caffeoylquinic acid
11	40.906	274-341	639	50.92	-	Isorhamnetin-3-O-di-glucoside
12	44.78	275-333	593	37.15	-	Apigenin 6,8-di-C-glucoside

presence of bioactive compounds such as tannins, flavonoids. In literature, the presence or absence of natural products are dependent on the polarity of the solvent used.¹² In addition, the yields extraction obtained in this study can be depends on many parameters, including the solvent used, composition of plant material, extraction method. The result of total phenolic and flavonoids content showed that the leaves methanolic extract and leaves n-butanol fraction have the highest amount than roots. According to previous studies on the total phenolic content in some other varieties of *Aristolochia albida*, total phenolic content in ethanolic extract of leaves was found to be 1.88 mg GAE/g DW²⁵. Also, the study conducted by Merouani et al²⁶ showed that the leaves methanolic extract of *A. longa* has the highest amount of flavonoids (52.3 7 $\mu\text{g CE/mg DW}$). In contrary, the studies carried by Djeridane et al²⁷ showed that the flavonoids content of roots was 0.81 mg CE/g DW of plant. The variation in the total phenolic and flavonoids contents might be attributed to the geographical factors as well as the different cultivation methods, growing seasons, geographic origin and differences in analytical methods.^{16,20} However, previous studies demonstrated that the species of genus *Aristolochiaceae*^{26,28} rich in phenolic compound such as alkaloids, flavonoids, tannins, coumarins, which are responsible for many biological activities including the anticancer, antioxidant and antimicrobial activities. Phenolic compounds are very important because of their action to scavenge the free radicals in the human body and to help maintaining healthy body by scavenging or removing the reactive oxygen species.²⁰ Several phenolic compounds of plants are known to be responsible for the radical scavenging and antioxidant activities. The natural antioxidants generally function as free radical scavengers and chain breakers, quenchers of singlet-oxygen formation and complexes of pro-oxidant metal ions.²¹ The antioxidant capacity and reducing power assay was observed by,²⁶ where the DPPH radical scavenging activity and reducing capability to convert the potassium ferricyanide (F^{+3}) complex to form potassium ferrocyanide (Fe^{+2}) in the leaves methanolic extract of *A. longa* were: $\text{IC}_{50} = 55.04 \pm 1.29 \mu\text{g/mL}$ and $\text{EC}_{50} = 0.2 \pm 0.019 \text{ mg/mL}$. This difference might be to the concentration of antioxidant compounds (specially flavonoids) in the extract.

The HPLC analysis of leaves n-butanol fraction, revealed the presence of two major bioactive polyphenolic flavonoids (kaempferol and apigenin) which explained heir highest scavenging ability. The antioxidant properties of flavonoids are widely known.^{29,30} Many flavonoids compounds (flavones, flavonols, flavonones, and catechin) have antioxidant activities such as peroxyxynitrite scavenging ability, metal chelating and free radical scavenging capacities. Flavonoids have strong antioxidant properties, which might be due to their ability to chelate transition metal ions, such as Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Mg^{2+} , catalyse electron transport, and scavenge free radicals.³¹ Previous studies have shown that kaempferol, some glycosides of kaempferol and several kaempferol-including plants have antioxidant activity not only *in vitro*, but also *in vivo*.^{32,33} Various studies showed that Kaempferol has an important anti-inflammatory activity. It can inhibit TNF- α activity, IL-1 β and IL-8 expression.³⁴⁻³⁶ On the other hand, a number of biological effects of Apigenin in numerous mammalian systems *in vitro* as well *in vivo* are related to its antioxidant and antigenotoxic effects and its role in scavenging free radicals.^{37,38} In addition, several properties have been attributed to Apigenin and its derivative, including antioxidant, anti-inflammatory and anti-carcinogenic effects.^{39,40}

Conclusions

In view of the result found, *A. longa* leaves marked a high level of flavonoids compared to the roots level. In addition, the same part of the plant exhibited strong antioxidant abilities. These data suggest that *A. longa* can be used as a precious source of antioxidant compounds to prevent different diseases such as, cancer, Alzheimer etc.

Authors' Contributions

BM, ATT and PS designed the study. SA performed the experiments. MM prepared the samples and analysed the fractions composition .SA wrote the paper with input from all authors..

Conflict of Interest Disclosures

The authors declare they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We would like to thank the Algerian ministry of high education and scientific research for support as well as the Laboratory of Research,

Bioconversion, Engineering Microbiology and Health Safety, University Mustapha Stambouli Mascara for technical assistance.

References

- Neinhuis C, Wanke S, Hilu KW, Muller K, Borsch T. Phytochemistry of Aristolochiaceae based on parsimony, Likelihood and Bayesian analyses of trnL-trnF. *Plant Syst Evol*. 2005;250:7-26.2. doi:10.1007/s00606-004-0217-0.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*. 2003;23(4):519-534. doi:10.1002/med.10033.
- Lattanzio V, Kroon PA, Quideau S, Treutter D. Plant phenolics – secondary metabolites with diverse functions. In: Lattanzio V, Daayf F, Lattanzio V, eds. *Recent Advances in Polyphenol Research*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009. doi:10.1002/9781444302400.ch1
- Pacheco AG, Machado de Oliveira P, Piló-Veloso D, Flávio de Carvalho Alcântara A. ¹³C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. *Molecules*. 2009;14(3):1245-1262. doi:10.3390/molecules14031245.
- Benarba B, Pandiello A, Elmallah A. Anticancer activity, phytochemical screening and acute toxicity evaluation of an aqueous extract of *Aristolochia longa* L. *Int J Pharm Phytopharm Res*. 2016;6(1):20-26. doi:10.24896/eijppr.2016614.
- Heinrich M, Chan J, Wanke S, Neinhuis C, Simmonds MS. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2--a global assessment based on bibliographic sources. *J Ethnopharmacol*. 2009;125(1):108-144. doi:10.1016/j.jep.2009.05.028.
- Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci*. 2012;3:222. doi:10.3389/fpls.2012.00222.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan BB, Grissem W, Jones RJ, eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville, MD : American Society of Plant Physiologists, 2000.
- Sharma V, Janmeda P. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia nerifolia* leaves. *Arab J Chem*. 2017; 10(4):509-514. doi:10.1016/j.arabjc.2014.08.019.
- Njoku V, Obi C. Phytochemical constituents of some selected medicinal plants. *Afr J Pure Appl Chem*. 2009;3(11):228-233.
- Sabri FZ, Belarbi M, Sabri S, Alsayadi Muneer MS. Phytochemical screening and identification of some compounds from Mallow. *J Nat Prod Plant Resour*. 2012;2(4):512-516.
- Alorkpa EJ, Boadi NO, Badu M, Saah SA. Phytochemical screening, antimicrobial and antioxidant properties of assorted *Carica papaya* leaves in Ghana. *J Med Plants Stud*. 2016;4(6):193-198.
- Feknous S, Saidi F, Mohamed- Said R. Extraction, characterization and identification of some active secondary metabolites of lemon balm (*Melissa officinalis* L). *Revue "Nature and Technology". A-sciences Fundamentals and Engineering*. 2014;11:7-13.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*. 1965;16(3):144-158.
- Bougandoura N, Bendimerad N. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha* ssp. *Nepeta* (L.) Briq. *Nature & Technology*. 2013;9:14-19.
- Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY, Lee CY. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agric Food Chem*. 2003;51(22):6509-6515. doi:10.1021/jf0343074.
- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Society of Nutrition and Dietetics*. 1986;44(6):307-315. doi:10.5264/eiyogakuzashi.44.307.
- Waterman PG, Mole S. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994.
- Bello IA, Ndukwe GI, Audu OT, Habila JD. A bioactive flavonoid from *Pavetta crassipes* K. Schum. *Org Med Chem Lett*. 2011; 1(1):14. doi:10.1186/2191-2858-1-14.
- Hue SM, Boyce AN, Somasundram C. Antioxidant activity, phenolic and flavonoid contents in the leaves of different varieties of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Aust J Crop Sci*. 2012;6(3):375-380.
- Rashmika PP, Manish PP. Evaluation of antioxidant activity of *Corchorus aestuans* Linn leaves extracts. *Int Res J Pharm*. 2012;3(7):233-238.
- Sreejayan N, Rao MN. Free radical scavenging activity of curcuminoids. *Arzneimittelforschung*. 1996;46(2):169-171.
- Assefa AD, Ko EY, Moon SH, Keum YS. Antioxidant and antiplatelet activities of flavonoid-rich fractions of three citrus fruits from Korea. *3 Biotech*. 2016;6(1):109. doi:10.1007/s13205-016-0424-8.
- Barros L, Ferreira MJ, Queirós B, Ferreira ICFR, Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem*. 2007;103(2):413-419. doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.038.
- Guinnin FFD, Sacramento IT, Ategbom JM, Agbangnan CDP. Physico-chemical composition and radical scavenging activity evaluation of the extracts of *Aristolochia albidula* Duch. (*Aristolochiaceae*) of Benin. *J Appl Biosci*. 2016;107(1):10460-10470. doi:10.4314/jab.v107i1.11.
- Merouani N, Belhattach R, Sahli F. Evaluation of the biological activity of *Aristolochia longa* L. extracts. *Int J Pharm Sci Res*. 2017; 8(5):1978-1992. doi:10.13040/ijpsr.0975-8232.
- Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Maamri S, Djireb F, Stocker P. Phenolic extracts from various Algerian plants as strong inhibitors of porcine liver carboxylesterase. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2006;21(6):719-726. doi:10.1080/14756360600810399.
- Jegadeeswari P, Daffodil ED, Mahan VR. Quantification of total phenolics, flavonoid and in vitro antioxidant activity of *Aristolochia bracteata* Retz. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014;6(1):747-752.
- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000;63(7):1035-1042. doi:10.1021/np9904509.
- Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*. 2001; 8(7):797-807. doi:10.2174/0929867013373011.
- Kaur P, Arora S. Polyphenols of *Caesalpinia* spp. *J Chin Clin Med*. 2010;5(5):282-290.
- Aniya Y, Koyama T, Miyagi C, et al. Free radical scavenging and hepatoprotective actions of the medicinal herb, *Crassocephalum crepidioides* from the Okinawa Islands. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28(1):19-23. doi:10.1248/bpb.28.19.
- Kampkötter A, Gombitang Nkwonkam C, Zurawski RF, et al. Effects of the flavonoids kaempferol and fisetin on thermotolerance, oxidative stress and FoxO transcription factor DAF-16 in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Arch Toxicol*. 2007;81(12):849-858. doi:10.1007/s00204-007-0215-4.
- Kowalski J, Samoedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep*. 2005;57(3):390-394.
- Lee S, Kim YJ, Kwon S, et al. Inhibitory effects of flavonoids on TNF- α -induced IL-8 gene expression in HEK 293 cells. *BMB Rep*. 2009;42(5):265-270. doi:10.5483/bmbrep.2009.42.5.265.
- Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from *Bauhinia variegata*. *Phytother Res*. 2008;22(7):957-962. doi:10.1002/ptr.2448.
- Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J Nutr*. 2004;134(12 Suppl):3479s-3485s. doi:10.1093/jn/134.12.3479S.
- Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH. Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;767:13-20. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.04.006.
- Škerget M, Kotnik P, Hadolin M, Hraš AR, Simonič M, Knez Ž. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chem*. 2005; 89(2):191-198. doi:10.1016/j.foodchem.2004.02.025.
- Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol*. 2006;17(9):505-512. doi:10.1016/j.tifs.2006.04.004.