

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité/Option : Immunologie Appliquée
Département : biologie

Thème

Etude phytochimique et Evaluation de l'activité anti-inflammatoire d'une plante médicinale : *Ephédra alata alenda*

Présenté par :

- ATATRA Amani
- BOUHDICHE Loubna

Devant les jurys composées de :

Président : Mme Braik.A	M.A.A	Université de Guelma
Examinatrice : Mme boussenane.H	M.A.A	Université de Guelma
Encadreur : Mr Bouden.I	M.A.A	Université de Guelma

Juin 2018

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier le bon Dieu tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je tiens à remercier à travers cet ouvrage les personnes auxquelles je dois tout le respect pour leurs efforts fournis pour former et porter la bonne connaissance aux étudiants.

*Je tiens à saluer nos professeurs qui ont montré une grande patience et bonne volonté pour nous transmettre une culture enrichissante ajoutée à notre longue carrière et nous ont ressuscité de notre latence, et je cites particulièrement Mme **AOUISSI** et Mme **BENDJEDOU**.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Mme **BRAIK**, pour l'honneur qu'elle me fait de présider le jury et d'évaluer ce travail ; qu'elle trouve ici l'expression de ma grande reconnaissance.*

*Je suis très sensible à l'honneur que me fait Mme **BOUSSENANE H**, en acceptant d'examiner ce travail et faire partie du jury. Qu'elle trouve ici mes sincères remerciements. Permettez-moi de vous exprimer ma gratitude et mon profond respect.*

*Ma gratitude s'adresse aussi à Mr **BOUDEN Ismail** mon tuteur universitaire d'avoir accepté de diriger ce travail aussi pour son enthousiasme commutatif, sa compétence, sa disponibilité et surtout pour sa patience ; qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes marques de respect, j'ai beaucoup appris de vous.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et toute ma reconnaissance à l'égard de Mme **HIMER Ratiba** d'avoir accepté de diriger ce travail notamment la pratique au sein du laboratoire de Biochimie, elle a toujours montré une modestie à l'écoute et était très disponible pour de précieux conseils ; je la remercie pour la confiance qu'elle m'a accordé quotidiennement. Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*J'exprime aussi mes remerciements et ma gratitude à Mme **BOUGHAZI Ghania**, à tout le personnel du laboratoire pour leurs encouragements et leurs aides précieuses durant toute la période de la formation en master.*

*J'aimerais également exprimer ma gratitude à Mme **ATATRA Fadila**, qu'elle trouve ici ma profonde reconnaissance pour son aide précieuse à L'Hôpital «IBN- ZOHR», et pour sa patience malgré ses nombreuses préoccupations.*

Je tiens à remercier tout particulièrement ma famille qui m'a accordé la liberté d'action et la patience nécessaire pour réaliser ce travail de m'avoir encouragé et soutenu .Sans eux, je n'en serais pas là.

Je n'oublie bien évidemment pas mes camarades de classe et les remercie chaleureusement pour tous ces agréables moments passés ensemble.

ATATRA Amani

Bouhidiche Loubna

Dédicace

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que

Je dédie cette mémoire...?

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et Source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive. , à toi

mon père.

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; **maman que j'adore.***

*Mes sœurs : **sara et amina**, qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*À ma petite fille choyée : **mayassine***

*A mon cher petit frère **M. Skander** Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré, pour toute la spontanéité et ton élan chaleureux, Je te dédie ce travail.*

Puisse Dieu le tout puissant exhausser tous tes vœux

A la mémoire de mon grand-père paternel, la mémoire de ma grand-mère maternelle

Qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.

*A mon très cher fiancé **oussama** Quand je t'ai connu, j'ai trouvé l'homme de ma vie, mon âme sœur et la lumière de mon chemin. Ma vie à tes côtés est remplie de belles surprises. Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études. Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.*

*A ma sœur, que ma mère n'a pas enfantée, à mon jumeau spirituel, qui me rend heureuse dans ma douleur, qui me rend au comble de mon bonheur quand je la vois seulement, elle est mon amie, et mon jumeau, votre Seigneur, ne me prive pas d'elle. Je t'aime ma chère.....**kahina** <<J - K >>*

A ceux qui aiment la fraternité et se distinguent par la loyauté et donnent aux sources de la pure honnêteté à ceux avec qui j'étais heureux, et avec leurs bénédictions dans les chemins de la vie douce et triste je marchais à ceux qui étaient avec moi sur le chemin du succès et du bien

A qui j'ai su les trouver et m'a appris à ne pas les gaspiller

Mes amis : **Hana**<< **ritel amani** >>, **Zeyneb, Amani**

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Loubna



Dédicace

Ce travail, est bien au-delà, je le dois à mes très chers parents qui m'ont fournis au quotidien un soutien et une confiance sans faille et de ce fait, je ne saurais exprimer ma gratitude seulement par des mots. Que dieu vous protège et vous garde pour nous.

A ma précieuse sœur Tahani, les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à ton égard.

A mon cher frère Anwar que j'aime tant.

A ma grande famille : je cite en ma grand-mère, mes tantes, mes oncles ainsi que mes cousines et cousins dont je cite particulièrement Anis.

A Mr Zaghdoud Yacine : pour ses conseils précieux et son soutien moral.

A mes chers amis : Noureddine, Marwa, Amalia, Loubna, Hana, Chaima, Salima, Mohsen, Amine, Haroun, Bassem, Hicham, pour leur fidélité.

A ma chère amie, Khelafia Nada qui m'a soutenue durant tout le parcours et chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.

A tous mes amis avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur.

A mes camarades de classe je les remercie chaleureusement pour tous ces agréables moments passés ensemble.

A la personne qui m'a dit que je n'ai pas le niveau et que je n'y arriverais jamais au master

A ceux qui m'ont sous-estimés et a ceux qui ont voulu étouffer mes ambitions et mes compétences et anéantir mes efforts et mes persévérances

Vous étiez pour moi un déclic pour me resaisir et entreprendre le chemin du succès et de réussite

Que toute personne m'ayant aidée de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

ATATRA Amani

« Rien n'est poison, tout est poison: seule la dose fait le poison »

-Paracelse-

الملخص

يكمن الكثير من الاهتمام البحثي الحالي في دراسة الجزيئات المضادة للالتهابات من أصل طبيعي.

الدراسة الحالية هي جزء من دراسة وتقييم كيميائي للنشاط المضاد للالتهاب في المختبر والجسم الحي لمستخلصات من أوراق الإيفيدرا الاتا علندة التي لها أهمية دوائية كبيرة في جميع أنحاء العالم وتشتهر بمقاومة الجفاف، يبدو أن الأهمية الدوائية لهذا النبات يتجاهلها جزء كبير من السكان. لقد تمت الدراسة الفيتوكيميائية لنبات العلندة التي تنمو في الصحراء الجزائرية التي أثبتت وجود مختلف عناصر الأيض الثانوية في النبات مثل القلويدات ، البوليفينول ، التانينات، السابونوزيدات، الكومارينات ، الستيرويدات ، الغلوسيدات، ويتكون من الاختبارات التي تجعل من الممكن تحديد المجموعات الكيميائية المختلفة الموجودة في الجهاز النباتي.

تقييم نسبة البوليفينولات الكلية من خلال طريقة فولين-تشوكالتو أما الفلافونويدات من خلال طريقة ثلاثي كلوريد الألمنيوم. التحديد الكمي للبوليفينولات الكلية يكشف أن المستخلص المائي غني نسبة من البوليفينولات 69.01 ± 4.23 المعبر عنها في مكافئ حمض الغالان لكل غرام وكذلك أعلى محتوى من الفلافونويدات بالنسبة 124.23 ± 6.42 المعبر عنها في مكافئ حمض كاتشين

دراسة النشاط المضاد للالتهاب مخبريا حسب طريقة تثبيط تحريب البروتينات ومن خلال النتائج نجد أن المستخلص المائي الإيفيدرا الاتا علندة يثبط بشكل معنوي جدا تحريب ألبومين المصل البقري بمعدل 79.97% للجرعة 1500 مغ/مل

تقييم النشاط المضاد للالتهابات في المختبر باستخدام طريقة تثبيت الغشاء باستخدام خلايا الدم الحمراء البشرية. إن التأثير الوقائي للمستخلص ضد انحلال خلايا الدم الحمراء الناتجة عن نقص التوتر، يكون معنويا عند تركيز 500 ميكروجرام / مل (48.97%) و 1000 ميكروجرام / مل (58.86%)، ويصل إلى نسبة عالية جدا. كبير 78.43% بتركيز 1500 ميكروجرام / مل. تأثيرات عالية نسبيا مقارنة مع ديكلوفيناك الصوديوم (91.68% عند 1500 ميكروجرام / مل)

دراسة النشاط المضاد للالتهاب في الجسم الحي الالتهاب، المخرض عند الفئران عن طريق حقن الفورمول هو نموذج معياري عملي. المستخلص المائي يظهر نشاطا مضادا للالتهاب مهم فهو يثبط بشكل معنوي جدا تطور الوذمة الناتجة عن الفورمول ويخفض بشكل ملحوظ تجنيد الخلايا المناعية في موقع الالتهاب.

تقييم النشاط المضاد للالتهاب لمستخلص الإيفيدرا الاتا علندة يظهر أن هذه النبتة لديها قدرة دوائية وهذا الذي يدعم الاستخدام التقليدي والعقلائي لها للتخفيف من حالات الالتهاب المختلفة.

الكلمات المفتاحية: التهاب المفاصل الروماتويدي، التهاب، الإيفيدرا الاتا علندة، النشاط المضاد للالتهابات في المختبر، ديكلوفيناك، نشاط مضاد للالتهابات في الجسم الحي، الفورمول.

Résumé

Une grande partie de l'intérêt des recherches actuelles porte sur l'étude de molécules anti inflammatoires d'origines naturelle.

La présente étude s'inscrit dans le cadre de faire l'étude phytochimique et évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vitro* de l'extrait aqueux de la partie aérienne de la plante médicinale *Ephédra alata alenda* dotée d'une grande importance pharmacologique dans le monde et réputée par sa résistance à la sécheresse. L'importance pharmacologique de la plante semble être ignorée par une grande partie de la population.

L'étude phytochimique sur la poudre de la plante qui consiste des tests qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal et qui a démontré la présence de divers métabolites secondaires dans la plante tels que les alcaloïdes, les polyphénols, les tanins, les saponosides des coumarines, des stérols, les terpènes et les glycosides.

L'évaluation de la teneur en polyphénols totaux par la méthode du réactif de Folin-Ciocalteu et celle des flavonoïdes par la méthode du trichlorure d'aluminium. La détermination quantitative des polyphénols totaux révèle que l'extrait aqueux est riche en polyphénols avec une teneur de 69,01mg GAE/g MS exprimée en équivalent acide gallique par g et une teneur plus élevée en flavonoïdes avec 124,23ECa/g MS pour l'extrait aqueux exprimée en équivalent acide catéchine.

L'extrait de *Ephédra alata alenda* est testé pour ses activités anti-inflammatoires *in vitro* par l'évaluation de sa capacité à protéger le sérumalbumine bovine (BSA) contre la dénaturation thermique. D'après les résultats : l'extrait aqueux d'*E.alata alenda* inhibe très significativement la dénaturation du BSA avec un taux de 79.97% à la dose 1500µg/ml

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait aqueux, par la méthode de stabilisation membranaire en utilisant les globules rouges humains (GRh). L'effet protecteur de l'extrait contre l'hémolyse des globules rouges provoqué par hypotonie, est significatif à la concentration de 500µg/ml (48,97 %) et 1000µg/ml (58,86%), et atteint un pourcentage très significatif de 78,43 % à une concentration de 1500µg/ml. des effets relativement élevé par rapport au Diclofénac sodique (91,68 % à 1500µg/mL)

L'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vivo* qui consiste une provocation d'une inflammation aigue induite chez la souris par l'injection du formol est un modèle standard et pratique. L'extrait aqueux montre une activité anti-inflammatoire importante. Il inhibe très significativement le développement de l'œdème de la patte induite par le formol il a également réduit significativement le recrutement des cellules immunitaires dans le site inflammatoire.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait d'*Ephédra alata alenda* montre que cette plante possède un pouvoir pharmacologique, ce qui supporte son usage traditionnel rationnel pour le soulagement de diverses affections inflammatoires

Mots clés : Polyarthrite rhumatoïde, Inflammation, *Ephédra alata alenda*, activité anti-inflammatoire *in vitro*, diclofenac, activité anti-inflammatoire *in vivo*.

Abstract

Most of the current researches are based on the study of naturally occurring anti-inflammatory molecules

The present work deals with the phytochemical study and evaluation of the anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo* of the medicinal plant *Ephedra alata alenda* which has a great pharmacological importance in the world, And renowned for its resistance to drought.

The pharmacological importance of the plant seems to be ignored by a large part of the population.

The phytochemical study on the plant which Consists tests that reveal different chemical groups contained in a plant organ has demonstrated the presence of various secondary metabolites such as alkaloids, polyphenols, tannins, coumarins, saponosides, sterols, glycosides and terpenes.

The evaluation of the total polyphenol content by the Folin-Ciocalteu reagent method, and the flavonoids by the aluminum trichloride method, Based on The quantitative determination of the total polyphenols reveals that the aqueous extract is rich in polyphenols with a content of 69.01 mg GAE / g MS expressed in gallic acid equivalent per g and a higher content of flavonoids with 124.23ECa / g MS for aqueous extract expressed in catechin acid equivalent.

The extract of *Ephedra alata alenda* is tested for its anti-inflammatory activities *in vitro* by evaluating its ability to protect bovine serum albumin (BSA) against thermal denaturation. According to the results: the aqueous extract of E.alata alenda inhibits very significantly the denaturation of BSA with a level of 79.97% at a dose of 1500 µg / ml.

The evaluation of the *in vitro* anti-inflammatory activity of the aqueous extract, by the method of membrane stabilization using human red blood cells (GRh) shows The protective effect of the extract against hemolysis of red blood cells caused by hypotonia, is significant at the concentration of 500µg / ml (48.97%) and 1000µg / ml (58.86%), and reaches a very high percentage. significant 78.43% at a concentration of 1500µg / ml. relatively high effects compared to Diclofenac sodium (91.68% at 1500µg / mL).

The study of *in vivo* anti-inflammatory activity, which involves the induction of acute inflammation induced in mice by the injection of formalin, is a standard and practical model. The aqueous extract shows significant anti-inflammatory activity. It significantly inhibited the development of formalin-induced paw edema and significantly reduced the recruitment of immune cells into the inflammatory site.

The evaluation of the anti-inflammatory activity of the extracts of *Ephedra alata alenda* shows that this plant possesses a pharmacological power, which supports its traditional and rational use for the relief of various inflammatory affections.

Key words: Rheumatoid arthritis, Inflammation, Ephedra alata alenda, *in vitro* anti-inflammatory activity, diclofenac, anti-inflammatory activity *in vivo*.

Liste des abréviations

- %AUG** : Pourcentage D'augmentation
- %INH** : Pourcentage D'inhibition
- AC₂O** : Anhydride D'acétate
- Acoet**: Acétate D'éthyle
- ACPA** : Anti-Citrullinated Protein Antibodies
- A_E** : Absorbance De L'échantillon Testé
- A-CSF**: Macrophage Colony-Stimulating Factor
- AINS** : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien
- ALCL₃** : Chlorure D'aluminium
- ANA**: Anti-Nuclear Antibodies
- ARNm**: Acide Ribonucléique Messenger
- Anti-CII** : Anti-Collagène De Type II
- Anti-GPI** : Anti-Glucose-6-Phosphate Isomérase
- Anti-RA33** : Anti-Ribonucleoprotein A2/B1
- DBA/1** : Dilute Brown, Non-Agouti Mice
- BSA** : Sérum Bovine Albumine
- CCP** : Peptides Citriques Citrullinés
- CHCL₃** : Trichlorométhane
- CINC-1**: Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1
- CO₃(Na)₂** : Carbonate De Sodium
- COX**: Cyclo-Oxygénase
- CTAP-3**: Connective Tissue-Activating Protein
- DCM**: Dichlorométhane
- DCs**: Cellules Dendritiques
- DNA**: Deoxy Ribonucleic Acid
- E**: Ephedra
- EAA**: *Ephedra Alata Alenda*
- EAEAA** : Extrait Aqueux *d'éphédra Alata Alenda*
- EC /MS**: Electro-Chemistry /Mass Spectrometry
- ELISA**: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ENA: Epithelial Neutrophil-Activating
ESL : Extraction Solide-Liquide
Eqag/G MS : Equivalents Acide Gallique Par Gramme De Matière Végétale Sèche
Eqc/G MS : Equivalents Catéchine Par Gramme De Matière Végétale Sèche
Fc : Fragment Constant
Fe CL₃ : Chlorure De Fer
FNS : Formule Numération Sanguine
FR : Factor Rhumatoïde
GM-CSF: Granulocyte –Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPI : Glucose -6- Phosphate Isomérase
GRH : Globules Rouge Humains
GRO: Growth-Related Oncogene
Grs: Globules Rouges
Gpx: Glutathion Peroxydase
H₂SO₄: Acide Sulfurique
H₃pmo₁₂o₄: Acide Phosphomolybdique
H₃PW₁₂O₄₀ : Acide Phosphotungstique
HCL : Acide Chlorhydrique
HSV : Herpès simplex virus
Hgcl₂ : Chlorure Mercurique
HLA : Humain Leukocyte Antigen
HLA-DR : Humain Leukocyte Antigen-Antigen D Related
ICAM-1 : Intra Cellular Adhesion Molecule -1/3
IL : Interleukine
IL-1Ra : Interleukin-1 Receptor Antagonist
Ig (-A, -E, -M, -G) : Immunoglobuline
ip: intra-péritonéale
KI : Iodure De Potassium
LB : Lymphocyte B
LT: Lymphocyte T
MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein -1
M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor
MCV : Herpès Simplex Virus
Meoh : Hydro-Méthanolique

Mg EAG/G MS : Milligramme Equivalente Acide Gallique Par Gramme De Matière Sèche

Mg EC/G MS : Milligramme Equivalente Catéchine Par Gramme De Matière Sèche

MIP-1 α : Macrophage Inflammatory protein -1

MMPs : Métalloprotéases

Mo₈O₂₃ : Molybdème

Moy : Moyenne

Nacl : Chlorure De Sodium

Nano₂ : Nitrite De Sodium

Naoh : Hydroxyde De Sodium

NF-Kb: Nuclear Factor of Kb

NH₃: Ammoniac

NH₄OH: Ammonium Hydroxide

NK: Natural Killer

Nm : Nanomètre

NO : Monoxyde D'azote

Ns : Non Significatif

One-Way ANOVA: One-Way Analysis Of Variance

P : Poids

PA : Partie Aérienne

PAD : Peptidyl-Arginine Désaminase

PAF : Facteur D'activation Plaquettaire

PBS : Phosphate Buffer Saline

Pc: Poids Corporelle

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

Ph : Potentiel Hydrogène

PMN : Poly-Morpho-Nucléaires

PR : Polyarthrite Rhumatoïde

RANK / RANKL: Receptor Activator Of NF-Kb / Receptor Activator Of NF-Kb Ligand

RANTES: Regulated On Activation, Normal T Cell Expressed And Secreted

ROS: Reactive Oxygen Species

Run X2: Runt-Related Transcription Factor 2

SCF: Stem Cell Factor

STAT6: Signal Transducer And Activator Of Transcription -6

SEM : Standard Erreur Moyenne

STAP : Connective Tissue-Activating Peptide

TFT : Teneur en Flavonoïdes Totaux

TGFB: Transforming Growth Factor B

TCP: Teneur en Composés Phénoliques

Timps: Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases

Th: T Helper

TLR: Récepteurs Toll-Like

TNF-A: Tumor Necrosis Factor-A

TNFR (I / II): Tumor Necrosis Factor Receptor (I / II)

TPT : Teneur en Polyphénols Totaux

UV : Ultra -Violet

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule -1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

W₈O₂₃ : Oxyde Bleu De Tungstène

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 1	Inflammation de la membrane synoviale	05
Figure 2	Rôle des synoviocytes dans l'inflammation articulaire	06
Figure 3	Rôle des macrophages au cours de la PR	09
Figure 4	Rôle des LB et LT dans la pathogénie de la PR	12
Figure 5	Répartition géographique de l' <i>Ephédra</i> dans le monde	20
Figure 6	Photo de la plante <i>Ephédra alata alenda</i>	21
Figure 7	Localisation de la Wilaya d'Ouargla	28
Figure 8	Aspect morphologique de l'espèce <i>ephedra alata alenda</i>	29
Figure 9	Courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	32
Figure 10	Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes	33
Figure 11	Administration de l'extrait aqueux d' <i>ephedra alata alenda</i> par voie intra-péritonéale.	37
Figure 12	Injection subplantaire du formol dans la patte arrière droite	37
Figure 13	Mesure du diamètre de gonflement de la patte.	38
Figure 14	Teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux de l'extrait brut aqueux d' <i>éphédra alata alenda</i> .	43
Figure 15	Effet d' <i>ephedra alata alenda</i> : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA.	45
Figure 16	Effet de l'extrait de <i>l'ephedra alata alenda</i> sur l'hémolyse des GRH.	47
Figure 17	Effet de l'extrait aqueux EAA sur l'œdème des pattes induites par le formol chez la souris. Les valeurs représentent les moyennes \pm Sd (n = 5).	51

Figure 18	Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte de groupe contrôle.	52
Figure 19	Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte de groupe standard.	53
Figure 20	Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte de groupe traité par EAEAA	54
Figure 21	Pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème des pattes droites des souris.	55
Figure 22	Taux des leucocytes chez les différents groupes traités.	56
Figure 23	Taux des monocytes chez les différents groupes traités.	57
Figure 24	Taux des lymphocytes chez les différents groupes traités.	58
Figure 25	Taux des granulocytes chez les différents groupes traités.	59
Figure 26	Taux des plaquettes chez les différents groupes traités.	59

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Paramètres géographiques et bioclimatiques de la région d'Ouargla	28
Tableau 2	Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans la poudre de partie arienne d'EAA.	41

Table des matières

Remerciement	
المخلص	
Résumé	
Abstract	
Abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01

Première partie : Etude bibliographique

Chapitre 1 : Inflammation et Polyarthrite Rhumatoïde

1. Polyarthrite Rhumatoïde.....	04
1.1. Cellules de la réponse immunitaire innée.....	05
1.1.1. Neutrophiles.....	05
1.1.2. Mastocytes.....	07
1.1.3. Plaquettes.....	08
1.1.4. Monocytes / macrophages.....	08
1.1.5. Cellules dendritiques.....	09
1.1.6. Cellules Natural Killer.....	10
1.2. Cellules de la réponse immunitaire adaptative.....	10
1.2.1. Lymphocytes B.....	10
1.2.2. Lymphocytes T.....	11
1.3. Médiateurs de l'inflammation.....	13
1.3.1. Auto-anticorps.....	13
1.3.2. Cytokines et chimiokines.....	15
1.3.2.1. Cytokines pro-inflammatoires.....	15
1.3.2.2. Cytokines anti-inflammatoires.....	16
1.3.2.3. Chimiokines.....	17
1.3.3. Enzymes métalloprotéases.....	18

Chapitre 2 : Ephédra alata alenda

1. Généralités sur la plante.....	20
1.1. Genre <i>Ephédra</i>	20
2. Sous espèce <i>Ephédra alata alenda</i>	21
2.1. Classification systématique d' <i>Ephédra alata</i>	21
2.2. Description botanique.....	21
2.3. Répartition géographique	22
2.4. Utilisation.....	22
2.5. Pharmacologie.....	23
2.6. Toxicologie.....	24
2.7. Travaux antérieurs.....	24
2.7.1. Activités biologiques de la plante	24
2.7.2. Chimie de la plante.....	26

Deuxième partie : Etude expérimentale

1. Matériel biologique.....	28
1. 1. Matériel végétal.....	28
1.2. Matériel animal.....	29
2. Méthodes.....	29
2. 1. Criblage phytochimique.....	29
2.1.1. Test des alcaloïdes.....	30
2.1.2. Test des saponosides.....	30
2.1.3. Test des flavonoïdes.....	30
2.1.4. Test des coumarines.....	30
2.1.5. Test des stérols et triterpènes.....	30
2.1.6. Test des Tanins.....	31
2.1.7. Test des glycosides.....	31
2.2. Préparation de l'extrait brut aqueux par Extraction Solide - Liquide.....	31
2.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques.....	32
2.3.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	32
2.3.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux.....	33
3. Evaluation de l'activité anti inflammatoire <i>in vitro</i>	34
3. 1. Inhibition de la dénaturation des protéines	34

3.2. Stabilisation de la membrane des globules rouges humain	35
4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	36
4.1. Prétraitement par l'extrait.....	36
4.2. Induction de l'inflammation.....	37
4.3. Évaluation de l'activité anti-œdémateuse.....	38
4.4. Taux des cellules immunitaire	39
4.5. Analyses statistique.....	39
I. Résultats	40
1. Screening phytochimique.....	40
2. Détermination de la teneur en composés phénoliques.....	42
2.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (TPT), en flavonoïdes totaux (TFT).....	42
2.2. Teneur en flavonoïdes totaux (TFT).....	44
3. Activité Anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	45
3.1. Inhibition de la dénaturation du BSA.....	45
3.2. Stabilisation des membranes des globules rouge humain.....	47
4. Activité Anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	50
4.1. Criblage de l'activité anti-œdémateuse.....	50
4.2. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte (% AUG).....	51
4.3. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH).....	54
4.4. Effet de l'extrait aqueux d'EAA sur le taux des cellules immunitaire.....	55
Conclusion et perspectives.....	63
Références bibliographiques.....	65

Introduction

L'inflammation est de loin le problème de santé le plus fréquent auquel nous sommes confrontés au cours de nos vies elle est associée à chaque infection qui se produit dans le corps telles que la grippe ou des infections pulmonaires mais l'inflammation ne se limite pas uniquement à des infections elle est également associée à des maladies courantes telles que l'artériosclérose l'arthrite ainsi que des processus cancéreux (**Mansour, 2015**)

Durant des siècles et même des millénaires, nos ancêtres ont utilisé les plantes pour soulager leurs douleurs, guérir leurs maux et panser leurs blessures. De génération en génération, ils ont transmis leur savoir et leurs expériences en s'efforçant quand ils le pouvaient de les consigner par écrit. Ainsi, même actuellement, malgré le progrès de la pharmacologie, l'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde et surtout les pays en voie de développement, en l'absence d'un système médical moderne (**Tabuti et al., 2003**). En effet, il existe environ 500.000 espèces de plantes sur terre, dont 80.000 possèdent des propriétés médicinales (**Quyoun, 2003**).

En Afrique, où les médicaments à base de plantes sont toujours utilisés par de nombreuses populations pour des soins sanitaires, le pouvoir thérapeutique des plantes était connu de façon empirique (**Koffi et al., 2009**).

La flore algérienne, avec ses différentes espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, reste très peu explorée tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacologique (**Merzoug, 2009**). L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie (**Konkon et al., 2006**). En effet, Les plantes avec leur nombre illimité constituent réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels, grâce à ses molécules qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structure chimique et d'activité biologique. Les plantes aromatiques sont caractérisées par leur richesse en principe actifs et en substances telles que les polyphénols et les flavonoïdes qui forment un groupe très diversifié de molécules dont plusieurs sont largement utilisées en thérapeutique comme anti-inflammatoires, antiprolifératives et anti

apoptotiques, grâce à leur capacité de se lier aux protéines, ce qui peut induire l'inhibition de certaines enzymes, la modulation de récepteurs ou même des facteurs de transcription. De ce fait les composés phénoliques peuvent toucher à la transduction du signal et donc toucher à la régulation des fonctions cellulaires (**Sandur et al., 2007**). Devant l'augmentation considérable du nombre de pathologies inflammatoire et les effets secondaire des médicaments synthétiques anti-inflammatoires de nombreux chercheurs de part le monde s'associent dans la recherche de composées d'origine végétale qui semblent moins agressifs et pourraient palier ces cotés négatifs (**Mansour, 2015**)

La thérapeutique anti-inflammatoire fait appel à diverses molécules synthétiques, les glucocorticoïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Bien qu'efficaces, ces médicaments présentent le plus souvent des effets indésirables qui peuvent limiter leur utilisation à long terme (**Lee et Feldman, 1997**). De ce fait, la recherche de substances d'origine végétale douées d'activités anti-inflammatoires s'avère très utile pour l'amélioration de la santé humaine.

Les membres de la famille des Ephedraceae, représentés par un seul genre «*Ephedra*», sont connus pour leurs nombreux usages en médecine traditionnelle dans le monde. La présente étude vise à contribuer à la valorisation de l'une de ces sous espèces, *Ephedra alata alenda* qui pousse dans la région d'Ouargla, et qui est réputée par sa tolérance élevée à la carence en eau. Néanmoins; elle reste peu étudiée dans la littérature sur le plan local. Et tout en sachant que le milieu désertique peut être un facteur favorable pour la production de métabolites secondaires dotés de nombreuses activités biologiques (**Timmermann et al., 1984**), notre choix s'est porté sur l'investigation de cette plante.

Notre étude est échelonnée à travers la mémoire sur trois parties:

La première, est consacrée à une synthèse bibliographique sur l'inflammation au cours de la polyarthrite rhumatoïde les aspects botaniques et phytochimiques de la plante. Des généralités, sur les activités anti-inflammatoires et les composés phénoliques et notamment les flavonoïdes, y sont aussi développées.

La deuxième partie illustre le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes étapes de notre travail expérimental : Des tests phytochimiques

préliminaires sont effectués sur les parties aériennes de la plante. Des dosages des composés phénoliques et des tests de corrélations entre les activités biologiques et les teneurs en composés phénoliques sont réalisés. En application, l'extrait de *Ephedra alata alenda* est testé pour ses activités anti-inflammatoires *in vitro* par l'évaluation de son capacité à protéger la sérumalbumine bovine (BSA) contre la dénaturation thermique, également par la méthode de stabilisation Membranaire en utilisant les globules rouges humains (GRh) Avec une présentation de différentes techniques d'analyse utilisées. Pour étudier l'activité de la plante après une inflammation aigue *in vivo*, un œdème local provoqué par le formol dans la patte de souris.

Et enfin La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus qui seront suivis d'une discussion et d'une conclusion générale et de perspectives envisageables.

Chapitre I : Inflammation et polyarthrite rhumatoïde

1. Polyarthrite rhumatoïde

La Polyarthrite Rhumatoïde (PR) est la plus fréquente des rhumatismes inflammatoires. Sa prévalence est d'environ 0,4% en Europe et est estimée entre 0,5 et 1% en France. En Algérie, la polyarthrite rhumatoïde est très fréquente, mais il y a un sérieux déficit d'études épidémiologiques pour donner des statistiques concernant l'évolution de cette maladie dans notre pays. En gros, et selon certaines estimations, elle toucherait de 0,7 à 1% de la population algérienne. C'est un peu plus de 300 000 personnes qui sont touchées par la polyarthrite rhumatoïde avec une très nette prédilection pour les femmes (**Kaddem, 2011**). Il s'agit d'une inflammation chronique évoluant par poussées, qui affecte principalement les femmes âgées de 30 à 50 ans (3 femmes pour 1 homme) mais qui peut également se déclarer aux extrêmes de la vie (**Gabay, 2004**). L'atteinte est poly-articulaire, symétrique et touche particulièrement les articulations des mains, des genoux et des pieds, mais elle peut être aussi systémique entraînant des manifestations extra-articulaires qui compromettent le pronostic vital. Elle se traduit par une hypertrophie de la membrane synoviale, tissu recouvrant la face interne des articulations, qui se trouve infiltrée par les différents acteurs cellulaires de l'inflammation (**Maclé, 2012**). Bien que l'étiologie et la pathogénie de la PR soie encore mal connue, il est établi que la membrane synoviale devient le siège d'une réaction inflammatoire impliquant des interactions entre les différents types cellulaires et les facteurs pro-inflammatoires responsables de la destruction ostéo-cartilagineuse (**Foulquier, 2007**).

Habituellement, la membrane synoviale est constituée de 1 à 4 assises de cellules synoviales qui fusionnent à leur partie profonde avec une zone de tissu fibreux lâche contenant des adipocytes, des fibroblastes, des mastocytes et des macrophages. Cette couche profonde se confond avec le tissu fibreux plus dense de la capsule articulaire (**Boutry et Cotten, 2010**). En somme, au cours de la PR, la membrane synoviale devient hyperplasique avec un épaissement de la couche cellulaire bordante (intima), un infiltrat de cellules inflammatoires périvasculaires, un œdème interstitiel et une néo-angiogénèse (**Figure 1**).

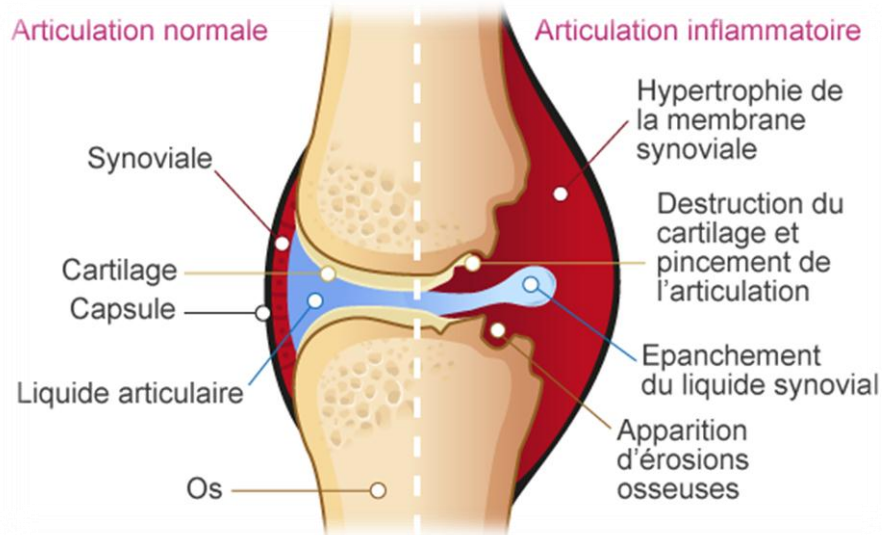


Figure. 1 : Inflammation de la membrane synoviale (Choy et Panayi, 2001).

L'épaississement de l'intima est probablement le résultat d'une prolifération des synoviocytes de type B aboutissant à un pannus synovial responsable de la destruction cartilagineuse et osseuse. En effet, le recrutement important de macrophages conduit à la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et à l'augmentation de la production des métalloprotéases (MMPs). Il s'ensuit un état inflammatoire chronique caractérisé par une infiltration cellulaire où prédominent les monocytes / macrophages, les lymphocytes B et les Lymphocytes T. Ces cellules infiltrant l'espace synovial sont dans un état diffus sans structure spécifique, ou organisées en microstructures. On trouve également des cellules dendritiques, des mastocytes et des plasmocytes qui s'accumulent sous la couche bordante. L'implication de ces cellules, ainsi que des différents médiateurs qu'elles expriment, dans l'initiation et l'évolution de l'inflammation au cours de la PR sera discutée dans la suite (Takemura *et al.*, 2001).

1.1. Cellules de la réponse immunitaire innée

1.1.1. Neutrophiles

Les granulocytes ou polymorphonucléaires (PMN) sont classés en 3 catégories : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. En raison de leur nombre élevé au site de l'inflammation par rapport aux éosinophiles et basophiles, les neutrophiles ont été plus largement décrits. Ils constituent des éléments essentiels de la défense contre les pathogènes. Ce sont les premières cellules à migrer au site de l'inflammation, suivies des

monocytes. Les neutrophiles libèrent dans l'espace extracellulaire des médiateurs cytotoxiques comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des protéases endommageant ainsi à la fois le pathogène et le tissu hôte. Il s'ensuit une accumulation dans l'intima de synoviocytes macrophage-like (synoviocytes de type A) et fibroblaste like (synoviocytes de type B) engendrant une hyperplasie de la membrane synoviale et une sécrétion excessive de métalloprotéases (**Figure 2**), (**Nathan, 2006**).

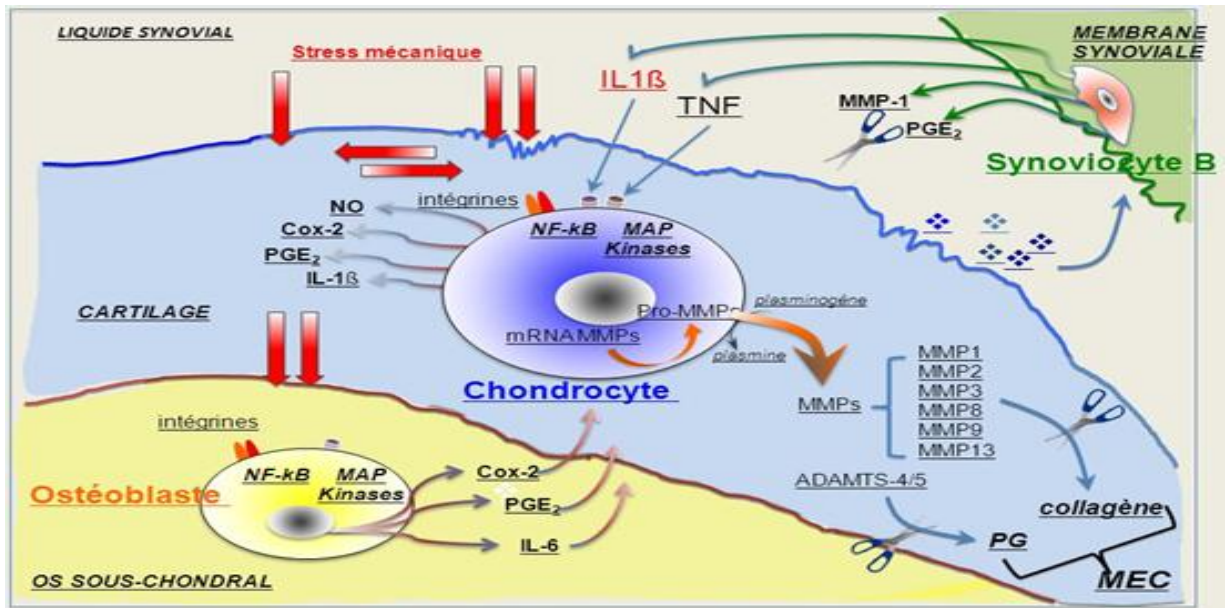


Figure. 2 : Rôle des synoviocytes dans l'inflammation articulaire (**Cascão et al., 2010**).

Une fois le pathogène éliminé, les neutrophiles entrent en apoptose et sont phagocytés par les macrophages. Dans le cadre de la PR, les mécanismes d'activation, de recrutement et d'apoptose des neutrophiles sont altérés. Dans le cas d'un dysfonctionnement du mécanisme apoptotique, les neutrophiles entament une nécrose. L'ingestion des débris cellulaires par les macrophages induit la production de cytokines pro-inflammatoires amplifiant ainsi le scénario inflammatoire de la PR (**Pillon et Michiels, 2014**).

En effet, chez les patients atteints de la PR avec une synovite active, les neutrophiles sanguins produisent beaucoup moins de ROS que ceux des individus sains ou les patients en rémission. De plus, chez les patients ayant une arthrite débutante, les neutrophiles sanguins montrent un niveau significativement moins élevé d'apoptose que les neutrophiles des patients présentant d'autres formes d'arthrite. Plus tard, cette même observation a été faite pour les neutrophiles du liquide synovial de patients montrant ainsi que le défaut d'apoptose des neutrophiles est une caractéristique de la PR. Ceci peut être

corrélé avec les niveaux élevés de cytokines anti-apoptotiques, comme l'IL-2, l'IL-4, l'IL-15 ou le GM-CSF, retrouvés dans les articulations des patients ayant une PR débutante (**Raza et al., 2006**).

Une étude récente, réalisée sur un modèle d'arthrite induite au collagène, a suggéré que les éosinophiles pourraient être les cellules à l'origine de l'échec des biothérapies anti-TNF- α et anti-CD20 chez certains patients. En effet, bien que ces cellules ne soient pas présentes en nombre élevé dans les articulations de patients atteints de PR, des protéines cationiques ayant pour origine les éosinophiles, sont retrouvées dans le liquide synovial de patients en échec de thérapies anti-TNF- α et anti-CD20. De plus, chez un certain nombre de patients, la sévérité de la PR a été associée à une hyperéosinophilie (**Bone et al., 2016**).

Quant aux basophiles, ils ont été plus décrits dans le cadre de la sécrétion d'auto-anticorps IgE et d'histamine dans les réactions allergiques auto-immunes associées à la PR. Cette sécrétion est médiée par l'IL-3 et induit l'expression par les basophiles de la cytokine pro-arthritogénique IL-6. En effet, une étude récente, réalisée sur un modèle d'arthrite induite au collagène, a suggéré que l'IL-3 aggrave les premières phases de l'arthrite en permettant l'augmentation du nombre de basophiles activés dans le sang circulant et en induisant l'expression d'anticorps anti-collagène dans le plasma. Cette même étude a montré que l'action de l'IL-3 n'intervient pas dans les phases tardives de la maladie (**Bruhl et al., 2009**).

1.1.2. Mastocytes

Les mastocytes sont des cellules granuleuses essentiellement présentes dans le tissu conjonctif et qui pourraient également jouer un rôle précoce dans le processus de la PR. Dans le tissu synovial, les mastocytes sont retrouvés dans l'intimamais peuvent être également retrouvés au niveau des sites de destruction du cartilage. Leur proximité avec les terminaisons nerveuses et les vaisseaux sanguins leur permet d'être en première ligne, avec les neutrophiles et les macrophages, pour initier une réponse inflammatoire et activer les cellules endothéliales. Chez les patients atteints de PR, le nombre de mastocytes est très augmenté (**Gotis-Graham et al., 1998**).

Comme pour les polynucléaires basophiles, l'IL-3 a été décrite comme une cytokine induisant la prolifération des mastocytes dérivant des précurseurs de la moelle de souris. Il a été montré que les glucocorticoïdes inhibent l'expression de cette cytokine. Dans

le cas de la PR, ce type de traitement est efficace pour supprimer quelques aspects de l'inflammation mais ne suffit pas pour traiter la maladie (**Eklund *et al.*, 1997**).

1.1.3. Plaquettes

Dans le liquide synovial, les plaquettes sécrètent également des quantités importantes de facteurs de croissance. Dans un modèle d'arthrite du lapin, il a été montré que parmi ces facteurs de croissance, le PDGF (Platelet-derived Growth Factor), un puissant agent angiogénique, induit une hyperplasie de la synoviale et la formation du pannus ; l'angiogénèse, c'est-à-dire la croissance de nouveaux capillaires sanguins à partir des vaisseaux préexistants, étant une composante majeure de l'inflammation développée au cours de la PR. En effet, la prolifération vasculaire au sein du pannus permet son développement et sa croissance, favorisant secondairement la destruction cartilagineuse (**Hayer *et al.*, 2015**).

1.1.4. Monocytes / macrophages

De par ses multiples fonctions biologiques, ce système contribue largement au déclenchement et au développement des maladies inflammatoires chroniques, comme la PR. Les cytokines IL-1, IL-3 et SCF (Stem Cell Factor) stimulent les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ pour qu'elles s'engagent dans la lignée myéloïde. Les précurseurs myéloïdes générés expriment CD33, CD34 et HLA-DR et se différencient sous l'effet de M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) et GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) en monocytes matures qui passent dans le sang périphérique. Ces monocytes circulants présentent un phénotype activé (libération de cytokines pro-inflammatoires et de prostanoïdes, expression de molécules d'adhésion), (**Grisar *et al.*, 2001 ; Kawanaka *et al.*, 2002**). Dans le sang périphérique, ils perdent leur marqueur précoce CD34 et deviennent CD14⁺. Il a été montré que le nombre de cellules CD14⁺ est supérieur chez les patients atteints de PR que chez les sujets sains, suggérant une altération de l'homéostasie monocyttaire en amont de leur activation synoviale. Parmi ces cellules CD14⁺, un grand nombre traverse la barrière trans-endothéliale et migre vers les compartiments articulaires (liquide synovial, membrane synoviale, pannus de l'os et du cartilage) où ils deviennent des macrophages (**Ma et Pope, 2005**).

Le système monocyte / macrophage représente une part importante de l'immunité innée développée au cours de la PR. L'activation de ce système, qui s'étend à la majorité

des précurseurs de la moelle osseuse de la lignée myéloïde, démontre le caractère systémique de cette pathologie.

1.1.5. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques qui jouent un rôle majeur dans la décision du type de réponse immunitaire à mettre en jeu. Elles font partie du système réticulo-histiocytaire et présentent dans certaines conditions comme leur nom l'indique, des dendrites (des prolongements cytoplasmiques).

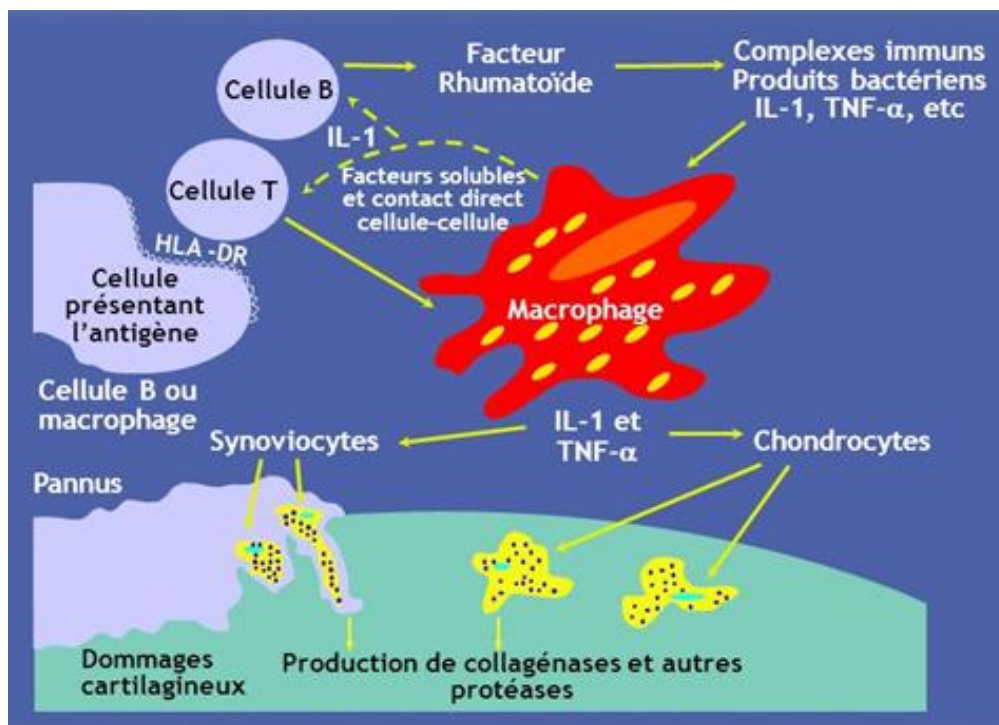


Figure 3 : Rôle des macrophages au cours de la PR (Grisar *et al.*, 2001).

Elles ne constituent pas une population homogène et regroupent 2 sous-populations dont les phénotypes et les fonctions sont assez bien caractérisés. Il a été montré que, parmi les sous-populations de DCs joue le rôle le plus important dans la pathogénie de la PR. En effet, un nombre élevé de ces cellules a été mis en évidence dans le liquide, mais surtout dans le tissu synovial et ce nombre est corrélé à la sévérité de la PR. Dans la suite, on désignera ces cellules par le simple terme DCs (Pettit *et al.*, 2007).

Par leur puissant pouvoir de présentation de l'antigène, les DCs jouent un rôle majeur dans la physiopathologie de la PR. Elles interviennent aussi dans la transformation phénotypique des Lymphocytes T naïfs en type Th1 ou Th2, selon les cytokines présentes dans le milieu. Les interactions entre DCs et cellules T se font par contact cellulaire soit à travers des interactions de type récepteur/ligand soit par l'intermédiaire de cytokines et de chimiokines. Les DCs produisent de l'IL-12 et de l'IL-23 qui font basculer la réponse immunitaire vers les types Th1 et Th17, respectivement. L'IL-23 augmente la production lymphocytaire T d'IL-17, qui à son tour va activer les fibroblastes synoviaux et augmenter leur réponse à d'autres signaux provenant des cellules T (**Figure 3**).

1.1.6. Cellules Natural Killer

Le rôle de ces cellules dans la pathogénie de la PR a été très peu étudié. Dans un modèle animal d'arthrite, la déplétion de ces cellules augmente la production d'auto-anticorps anti-DNA et accélère l'accumulation de Lymphocytes T CD4+ auto-réactifs. L'injection de cellules NK permet, par contre, la suppression de ces manifestations auto-immunes. De plus, une étude a reporté que les patients atteints de PR ont un nombre anormalement bas de cellules NK dans le sang périphérique en comparaison avec des individus sains (**Pridgeon et al., 2003**). Toutes ces observations suggèrent donc un rôle protecteur de ces cellules dans la PR. Cependant, ce rôle a été controversé, puisque les cellules NK représentent une large proportion des cellules présentes dans le liquide synovial de patients ayant une PR évoluée et que ces cellules produisent des taux élevés de cytokines essentielles pour la destruction osseuse ainsi que de chimiokines qui participent au recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation. De plus, une étude plus récente a montré que les cellules NK induisent in vitro la différenciation des monocytes en ostéoclastes, cellules responsables de la résorption osseuse. Cette étude a également montré que ces cellules sont aussi présentes dans les articulations de souris arthritiques et que leur déplétion réduit la sévérité de l'arthrite chez souris et prévient l'érosion osseuse (**Soderstrom et al., 2010**).

1.2. Cellules de la réponse immunitaire adaptative

1.2.1. Lymphocytes B

Les Lymphocytes B (LB) sont les premiers acteurs de la réponse immunitaire adaptative à avoir été mis en évidence dans la pathogénie de la PR. La découverte des

facteurs rhumatoïdes (FR), des auto-anticorps souvent de type IgM (mais pouvant être aussi de type IgA ou IgG) produits par les plasmocytes et dirigés contre les IgG, a conduit à l'hypothèse selon laquelle la PR pourrait être une maladie auto-immune causée par des auto-anticorps. Depuis, d'autres auto-anticorps ont été détectés chez les patients atteints de PR : des auto-anticorps anti-CCP (CyclicCitrullinated Peptide) et des auto-anticorps dirigés contre des antigènes du cartilage comme le collagène de type II ou l'aggrécane (**Figure 4**). A leur tour, les LB sont également capables d'activer les Lymphocytes T auto-réactifs. Ainsi, l'infiltration tissulaire des Lymphocytes T et les manifestations auto-immunes sont dépendantes des LB. En outre, les LB présents dans le thymus jouent un rôle dans l'acquisition du répertoire de Lymphocytes T en régulant la sélection positive de ces cellules (**Vita et al., 2016**).

1.2.2. Lymphocytes T

De nombreux arguments plaident en faveur d'un rôle essentiel des Lymphocytes T (LT) CD4+ dans la physiopathologie de la PR. D'une part, ils sont souvent retrouvés en abondance dans le tissu synovial et le liquide articulaire de patients atteints de PR, notamment les LT exprimant le phénotype mémoire CD4+CD45RO+ et les lymphocytes porteurs de marqueurs d'activation comme le CD40 ou le CD28 (**Weyand et al., 2015**). D'autre part, les modèles expérimentaux viennent à l'appui de cette théorie, notamment le modèle d'arthrite induite au collagène dans lequel l'arthrite ne peut être déclenchée en l'absence de LT actifs. Le rôle pivot des LT dans la pathogénie de la PR, est renforcé par l'hypothèse du peptide arthritogène. Le peptide arthritogène pourrait être d'origine exogène (agents infectieux ou super-antigènes) ou endogène (collagène de type II, protéoglycanes, glycoprotéine gp39 chondrocytaire). Il est reconnu par les LT CD4+, avec comme conséquences la prolifération et l'activation des LT, des lymphocytes B, la sécrétion de cytokines et de médiateurs inflammatoires. Ce pendant, plusieurs arguments plaident contre leur rôle exclusif : premièrement, la faible quantité de cytokines T-dépendantes (IL-2, IL-3, IL-4 et IFN- α) dans l'articulation par rapport à des cytokines produites par d'autres types cellulaires ; deuxièmement, les lymphocytes synoviaux sont des cellules peu actives présentes en faible nombre pendant la phase de multiplication avec des marqueurs d'activation tardifs ; troisièmement, l'absence d'oligoclonalité des LT dans la synoviale rhumatoïde ; quatrièmement, la destruction paraît souvent peu dépendante de la présence des cellules T et enfin, la déplétion par des anticorps monoclonaux anti-CD4

n'est pas toujours efficace en pratique clinique (Boissier *et al.*, 2002). Les LT synoviaux sont pour la plupart des cellules CD4+ de type Th1 produisant de l'IFN- α et de l'IL-2. Un autre sous-type de LT CD4+, les lymphocytes Th17, a également montré son importance dans la pathogénie de la PR au point que le concept d'une maladie de type Th1 soit remis en cause. La production d'IL-17 est la seule signature de ces lymphocytes Th17 dont l'influence sur la biologie des ostéoclastes a été démontrée. En effet, les lymphocytes Th17 produisent du RANKL et du TNF- α qui agissent directement sur les précurseurs d'ostéoclastes pour les engager dans un processus de différenciation. De plus, l'IL-17 induit l'expression de RANKL par les fibroblastes synoviaux et les ostéoblastes ce qui permet à ces Th17 de contrôler indirectement la résorption osseuse. La découverte de l'IL-17 et des contrôles direct et indirect qu'elle exerce sur le processus rhumatoïde a entraîné une redéfinition de la PR, qui n'est plus alors considérée comme une maladie de type Th1 mais plutôt comme une maladie Th1/Th17 (Weyand *et al.*, 2015).

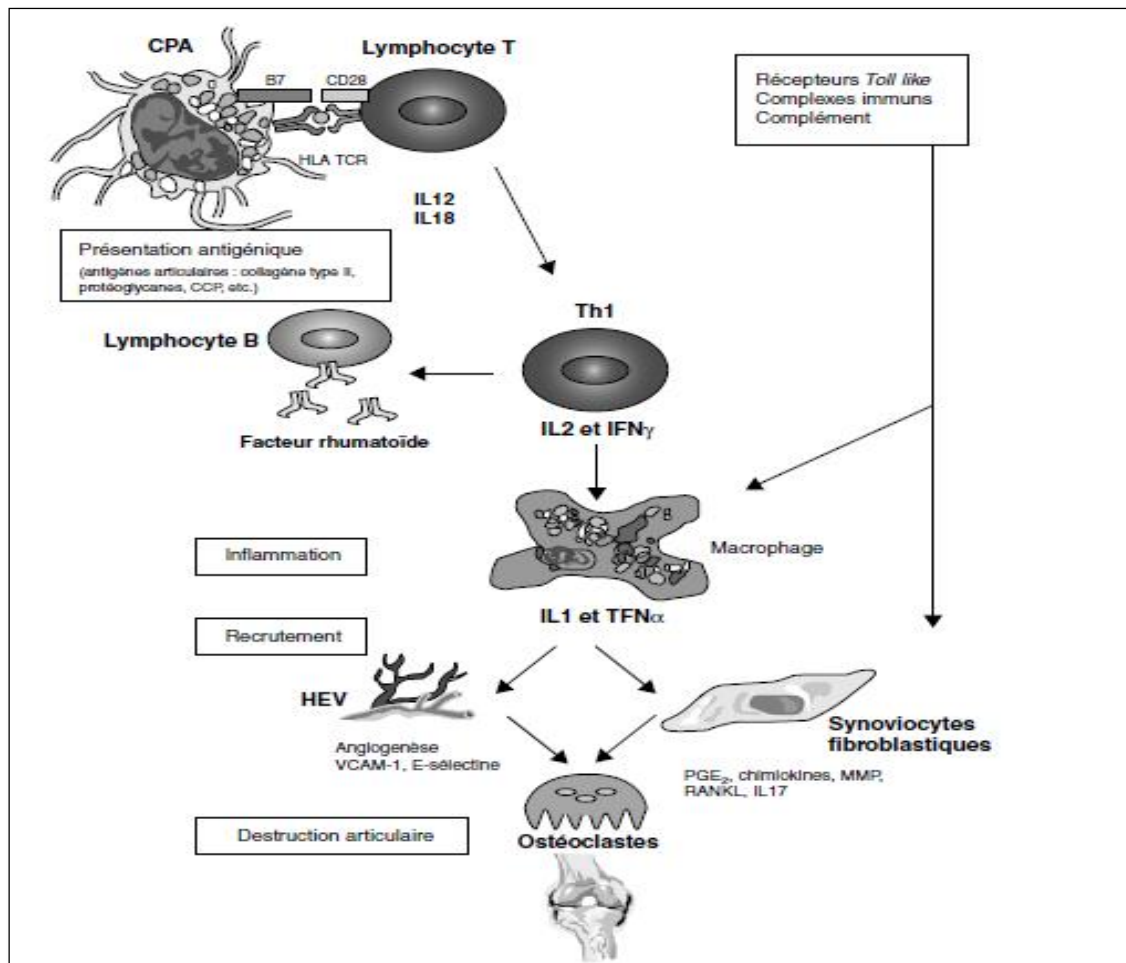


Figure 4 : Rôle des LB et LT dans la pathogénie de la PR (Morel *et al.*, 2004).

1.3.Médiateurs de l'inflammation

Le dysfonctionnement des différentes cellules de l'immunité observé au cours de la PR escertainement une conséquence d'un déséquilibre de la production de certains facteurs qui donne lieu à la surexpression ou à la suppression d'autres facteurs, notamment des anticorps, des cytokines, des chimiokines et des enzymes métalloprotéases. Tous ces facteurs constituent un réseau qui contribue aux caractères systémique et chronique de la PR.

1.3.1 Auto-anticorps

Des études réalisées chez les rongeurs ont montré que des anticorps spécifiques dirigés contre des auto-antigènes sont directement impliqués dans la pathologie de la PR et contribuent au caractère auto-immun de cette pathologie ; ils sont appelés auto-anticorps. Le plus documenté de ces auto-anticorps reste le facteur rhumatoïde (FR) mais on retrouve également les auto-anticorps dirigés contre les protéines citrullinées (ACPA ou Anti-Citrullinated Protein Antibodies), les auto-anticorps-anti-nucléaires (ANA ou Anti-NuclearAntibodies) dirigés contre les acides nucléiques, les auto-anticorps anti-collagène de type II (anti-CII) et les anticorps anti-Glucose-6-Phosphate Isomérase (anti-GPI) :

- **Facteur rhumatoïde (FR)** : il a été identifié en 1949 comme un auto-anticorps appartenant à la famille des Immunoglobulines M (IgM) dirigé contre la région constante des IgG autologues. Ce facteur est exprimé dans 60-85% des cas de PR. Il est établi qu'un taux sérologique élevé de FR est corrélé à l'aggravation des signes cliniques et témoigne donc de la sévérité de la maladie. Ce facteur a été identifié dans plusieurs modèles murins d'arthrite et comme pour la PR humaine, il est préférentiellement dirigé contre les IgG autologues ce qui confirme que cet anticorps est produit en réponse à un antigène endogène (**Vencovsky *et al.*, 2003**).

- **ACPA** : le déterminant antigénique de ces anticorps est l'acide aminé citrulliné obtenu par désimination de l'arginine par l'enzyme Peptidyl-Arginine Désiminase (PAD), (**Vossenaar *et al.*, 2003**). Le processus de citrullination des protéines synoviales a été identifié dans le modèle d'arthrite aiguë induite par *Streptococcus pyrogenes* et dans le modèle d'arthrite chronique induite au collagène. Les protéines citrullinées ont

également été identifiées dans la membrane synoviale de patients atteints de PR. Une méta-analyse a démontré que les auto-anticorps anti-CCP sont plus spécifiques de la PR que le FR. D'ailleurs, ces auto-anticorps ont été retrouvés chez des donneurs de sang plusieurs années avant l'apparition des premiers signes cliniques de PR et dans les modèles animaux, le transfert de ces auto-anticorps accentue la sévérité de l'arthrite ce qui souligne leur rôle effecteur. Récemment, des tests ELISA ont été développés pour détecter la présence des ACPA dans le sérum de patients et ont montré une grande performance dans le diagnostic de la maladie (**Cordonnier et al., 1996**).

- **Anticorps anti-nucléaires (ANA)** : ces auto-anticorps représentent un groupe hétérogène d'anticorps dirigés contre des fragments d'acides nucléiques. L'anti-RA33 est un auto-anticorps qui présente un intérêt particulier dans la PR. Dirigé contre la protéine A2 (33kDa), il est retrouvé dans 30% des cas de PR. Cependant, cet auto-anticorps reste moins spécifique que le FR ou les anti-CCP et son expression n'est pas corrélée avec le caractère érosif de la pathologie. En effet, les patients qui sont séropositifs pour cet auto-anticorps uniquement ne développent pas une PR agressive. L'anti-RA33 est également détecté dans plusieurs modèles d'arthrite expérimentale, spécifiquement chez le rat où il apparaît avant le déclenchement des signes cliniques (**Edwards, 2016**).
- **Anticorps anti-CII** : le collagène de type II est un constituant majeur du cartilage. Les auto-anticorps anti-CII ont été identifiés chez les patients atteints de PR sous leurs formes native et dénaturée. Cependant, la prévalence de ces auto-anticorps reste incertaine. En effet, la multiplicité des techniques de détection rend les résultats très disparates ce qui ne permet pas à ces auto-anticorps de constituer un marqueur de diagnostic ou d'activité de la PR. En revanche, pour les modèles animaux, la situation est beaucoup plus claire. Le modèle d'arthrite induite au collagène résulte d'une réponse auto-immune au collagène de type II (**Cho et al., 2007**).
- **Anticorps anti-GPI** : la Glucose-6-Phosphate isomérase est une enzyme de la voie de la glycolyse retrouvée dans toutes les cellules. Les auto-anticorps dirigés contre cette enzyme ont été identifiés chez les souris K/BxN. Ces auto-anticorps sont eux-mêmes arthritogéniques puisque le transfert passif du sérum de souris K/BxN à des souris normales induit une réponse auto-immune anti-GPI et une arthrite sévère. Cependant, très peu d'études ont réussi à déterminer une forte prévalence de ces auto-anticorps chez les patients atteints de PR (**Brennan et Innes, 2008**).

1.3.2. Cytokines et chimiokines

1.3.2.1. Cytokines pro-inflammatoires

- **TumorNecrosis Factor- α (TNF- α)** : ce médiateur classique de l'inflammation a été identifié comme une cytokine clé de la PR. Exprimé par les macrophages activés, les LT et les synoviocytes de la membrane synoviale, il régule directement le recrutement des ostéoclastes précurseurs et augmente l'expression de RANK par ces cellules. Le TNF- α module également la différenciation et la fonction des ostéoblastes en régulant l'expression de Runx2, facteur de transcription spécifique aux ostéoblastes. En effet, *in vitro*, il réduit l'expression de l'ARNm de la phosphatase alcaline, du collagène de type I et de l'ostéocalcine. De plus, les taux élevés de TNF- α retrouvés chez les patients atteints de PR sont souvent corrélés à une phase active de la maladie. L'importance de cette cytokine dans la pathogénie de la PR a entraîné le développement d'anticorps monoclonaux (Infliximab, Adalimumab) et de protéines de fusion (Etanercept, protéines formées par la fusion du domaine de liaison du TNFR II avec le domaine Fc de l'IgG) utilisés aujourd'hui comme traitements de la PR (**Cantagrel *et al.*, 2017**)

IL-1 : cette cytokine est produite par les macrophages activés et les fibroblastes de la membrane synoviale. Induite par le TNF- α , elle permet l'expression des enzymes métalloprotéases et de RANKL dans le tissu synovial favorisant ainsi la résorption osseuse (**Ji *et al.*, 2002**). Il a été montré que les souris déficientes en IL-1 sont totalement protégées de l'arthrite alors que les souris déficientes en TNF- α ne le sont que partiellement ce qui prouve l'importance de cette cytokine dans la pathogénie de la PR. Cette cytokine, existant sous 2 formes, α et β , exerce donc un rôle très important dans l'inflammation. Une étude a par ailleurs montré que l'IL-1 β est la seule forme qui permet l'induction de l'inflammation. En effet, les souris IL-1 $\beta^{-/-}$ ou IL-1 $\alpha/\beta^{-/-}$ ne répondent pas à l'induction de fièvre par la térébenthine alors que les souris IL-1 $\alpha^{-/-}$ répondent à cette induction. Bien que l'importance de l'IL-1 ait été largement démontrée, chez les patients atteints de PR, l'utilisation de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 (IL-1Ra) sous forme recombinante (Anakinra) a montré des propriétés anti-inflammatoires limitées (**Cantagrel *et al.*, 2017**).

- **IL-6** : L'action de l'IL-6 dans la membrane synoviale rhumatoïde se fait de concert avec le TNF- α et il est difficile de séparer l'une de l'autre : activation des cellules de

l'immunité, activation des cellules endothéliales et des synoviocytes, activation des ostéoclastes, induction des protéines de l'inflammation. L'IL-6 est présente à des taux élevés dans le sérum et le liquide articulaire des patients souffrant de PR. Ses taux sériques sont corrélés à l'activité de la maladie (**Hunter et Jones, 2015**).

- **IFN- γ** : Plusieurs études ont classé la PR comme une maladie à prédominance Th1 associée à une surexpression d'IFN- γ par les LT auto-réactifs. Cette classification découle surtout de l'étude du modèle d'arthrite induite au collagène où l'administration de l'IFN- γ augmente l'incidence et la sévérité de la maladie. Par contre, dans le modèle d'arthrite induite au protéoglycane, c'est l'effet inverse qui se produit. Ainsi, le paradoxe lié à la signalisation induite par l'IFN- γ rend les applications thérapeutiques basées sur le rôle de cette cytokine assez complexes (**Kaplan et al., 2002**).
- **Autres cytokines** : D'autres cytokines dépendantes ou non de l'expression de celles précédemment citées sont impliquées dans la pathogénie de la PR mais aucune preuve n'a jusqu'à lors été apportée quant à leur rôle central. Parmi ces cytokines, on retrouve l'IL-2, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21. Elles sont également retrouvées dans la membrane synoviale de patients atteints de PR. Par ailleurs, l'IL-18 identifiée d'abord comme un inducteur de l'IFN- γ présente également une activité pro-inflammatoire au sein de la membrane synoviale et contribue à l'accélération de l'athérosclérose chez les patients atteints de PR (**Isenberg et al., 2016**).

1.3.2.2. Cytokines anti-inflammatoires

En réponse à l'activation des cellules de l'immunité et aux cytokines pro-inflammatoires produites, des mécanismes anti-inflammatoires tentent de contrôler ce processus d'auto-réactivité installé dans les articulations. Ces mécanismes anti-inflammatoires sont gérés par des cytokines, dites de type Th2, parmi lesquelles on retrouve :

- **IL-4** : Il a été montré que cette cytokine est présente à des quantités très faibles dans le liquide synovial de patients atteints de PR. Ce manque en IL-4 contribue au déséquilibre des médiateurs de l'inflammation chez les patients atteints de PR. *In vitro*, l'IL-4 inhibe la formation d'ostéoclastes en bloquant de manière irréversible et STAT6 dépendante la voie RANK-RANKL. La thérapie génique par l'IL-4 de l'arthrite induite au collagène chez la souris a permis de montrer que le rôle protecteur de cette cytokine *in vivo* contre

la destruction cartilagineuse. En effet, l'IL-4 inhibe l'expression d'IL-6 et d'IL-17 et prévient ainsi la libération de collagène par les enzymes métalloprotéases activées (**Lubberts et al., 2000**).

- **IL-10** : Plusieurs modèles animaux ont permis de démontrer l'efficacité d'un traitement par l'IL-10 dans la réduction de l'inflammation et de l'infiltration cellulaire ainsi que dans la destruction articulaire au cours de l'arthrite. En effet, elle inhibe l'expression de l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α et augmente le ratio IL-1Ra / IL-1. Une étude réalisée en *ex vivo* sur des LT CD4+ de patients atteints de PR a permis également de montrer que l'IL-10 supprime les lymphocytes Th17 et stimule les lymphocytes Treg CD4+ CD25+. Cependant, le traitement de patients atteints de PR pendant 28 jours par l'IL-10 a plutôt montré des résultats décourageants en termes d'efficacité (**Schulze-Koops et Kalden, 2001**).
- **IL-13** : il s'agit d'une cytokine dite IL-4-like en raison de leurs homologies structurale et fonctionnelle. En effet, tout comme l'IL-4, l'IL-13 présente une activité inhibitrice sur les fonctions monocytaires. Dans le modèle d'arthrite induite au collagène, le traitement par cette cytokine inhibe l'expression de l'IL-17. Une étude réalisée sur un modèle d'arthrite chez le rat a montré que l'IL-13 inhibe l'expression des métalloprotéases 2 et 9 ce qui lui confère des propriétés anti-angiogéniques (**Haas et al., 2007**).

1.3.2.3. Chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines spécifiques du chimiotactisme qui aident les leucocytes à migrer à travers la barrière endothéliale et à atteindre le tissu synovial ce qui permet d'initier et d'entretenir l'arthrite. Cette famille de cytokines est constituée de 4 groupes classés selon la position de leurs résidus cystéines : les C-X-C, les C-C, les C et les C-X-C3. Le rôle des 2 derniers groupes ne paraît pas très important dans la pathogénie de la PR, hormis peut-être la lymphotactine, une chimiokine qui active les LT, les macrophages et les fibroblastes. Appartenant aux C chimiokines et majoritairement produite par les LT CD8+ et T CD4+, elle inhibe l'expression de certaines enzymes métalloprotéases par les fibroblastes synoviaux (**Blaschke et al., 2003**). Parmi les C-X-C-chimiokines impliquées dans la pathogénie de la PR, on retrouve l'IL-8, ENA-78, Gro- α , Gro- β et CTAP-3. Abondamment présentes dans le liquide synovial et le sérum de patients

atteints de PR en comparaison avec d'autres rhumatismes inflammatoires, elles sont chimio-attractives pour la plupart des cellules immunitaires mais préférentiellement pour les neutrophiles et possèdent des propriétés pro-angiogéniques. Parmi les C-C-chimiokines, on retrouve MCP-1, MIP-1 α et RANTES. Plus spécifiques du recrutement des macrophages que les C-X-C-chimiokines, elles sont détectées aux sites présentant des infiltrats extensifs et dans le sang périphérique des patients atteints de PR. Les interactions entre ces familles de chimiokines et les cytokines des voies Th1, Th17 et Th2 permettent de perpétuer l'inflammation au niveau des articulations ce qui contribue au caractère chronique de la PR (Szekanecz *et al.*, 1998).

1.3.3. Enzymes métalloprotéases

Les métalloprotéases ou MMPs représentent la famille des endopeptidases. Elles sont capables de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire dont le collagène, le protéoglycane, la fibronectine et la laminine. Au cours de la PR, la destruction du cartilage articulaire est causée par certaines de ces métalloprotéases dérivées à la fois de la synovite et des chondrocytes stimulés, cellules formant le cartilage. Ces cellules sur expriment les MMP-1, -3, et -9. D'autres cellules participent également à ce processus : les fibroblastes produisent MMP-2, les polynucléaires neutrophiles sécrètent quant à eux MMP-8 et MMP-9 alors que les macrophages produisent MMP-1 et MMP-9. Toutes ces MMPs sont sécrétées dans la cavité articulaire où elles attaquent la surface du cartilage immergée dans le liquide synovial. Parmi elles, la MMP-3 est une collagénase particulièrement augmentée dans le liquide synovial de patients atteints de PR et sa détection dans le sérum semble prédire le niveau de destruction articulaire (Yamanaka *et al.*, 2000). Cependant, dans le modèle d'arthrite induite au collagène, aucune différence significative n'a été notée entre les souris *mmp3*^{-/-} et les souris sauvages. Une autre MMP semble jouer un rôle primordial dans la destruction articulaire : il s'agit de la MMP-9, une gélatinase fortement exprimée par les ostéoclastes et particulièrement localisée dans le cartilage calcifié. Des quantités élevées de proMMP-9, forme inactive de MMP-9, ont été retrouvées dans le sérum et le liquide synovial de patients atteints de PR en comparaison avec des donneurs sains. Un marquage abondant de cette protéase a été également retrouvé dans les vaisseaux sanguins à proximité de la membrane synoviale, indiquant vraisemblablement une activité pro-angiogénique. Des inhibiteurs de ces MMPs, appelés TIMPs, sont également sécrétés par les mêmes cellules de l'infiltrat inflammatoire qui sécrètent les MMPs, mais il a été montré

que dans le liquide synovial rhumatoïde, le ratio MMPs / TIMPs est augmenté (**Yoshihara et al., 2000**).

Chapitre II : *Ephédra alata alenda*

1. Généralités sur la plante

1.1. Genre *Ephédra*

L'origine de l'*Ephédra* a parfois été considérée comme ancienne, peut-être dès ou avant l'éclatement de la Pangée (environ 200 millions d'années passant dans le Trias moyen) (Huang et Price, 2003).

La famille des Ephedraceae représentée par le seul genre *Ephédra* inclue environ 40 espèces dans le monde (Evans, 2009) est représentée par des arbustes dioïques vivaces à rameaux articulés, qui peuvent atteindre 1 à 3 mètre de haut, avec de minces tiges dressées, verts jaunâtres, intersectées et légèrement nervurées, à canalicules de 1,5 mm de diamètre et qui se termine par une pointe souvent acérée. Au niveau des nœuds, qui sont écarté de 4 à 6 cm, les feuilles réduites en écailles apparaissent triangulaires qui se développent en paires opposées ou en verticilles de trois, donnant à la plante l'aspect d'un arbuste sans feuille. De petites fleurs apparaissent en été (Limberger *et al.*, 2013; Ozenda, 1991; Abourashed *et al.*, 2003). Les espèces de ce genre peuvent pousser dans des conditions semi-arides et désertiques, ce qui rend les six continents appropriés pour la croissance de ce genre. Ce dernier se développe habituellement dans des sols sableux, des pentes sèches et des côtés secs de montagnes (Limberger *et al.*, 2013; Qingbiao, 2006) et qui poussent surtout dans la Chine, l'Inde, l'Egypte, le Moyen-Orient, en Europe et dans les Amériques (Hegazi et El-Lamey, 2011). La figure 5 montre la répartition du genre *Ephédra* dans le monde.

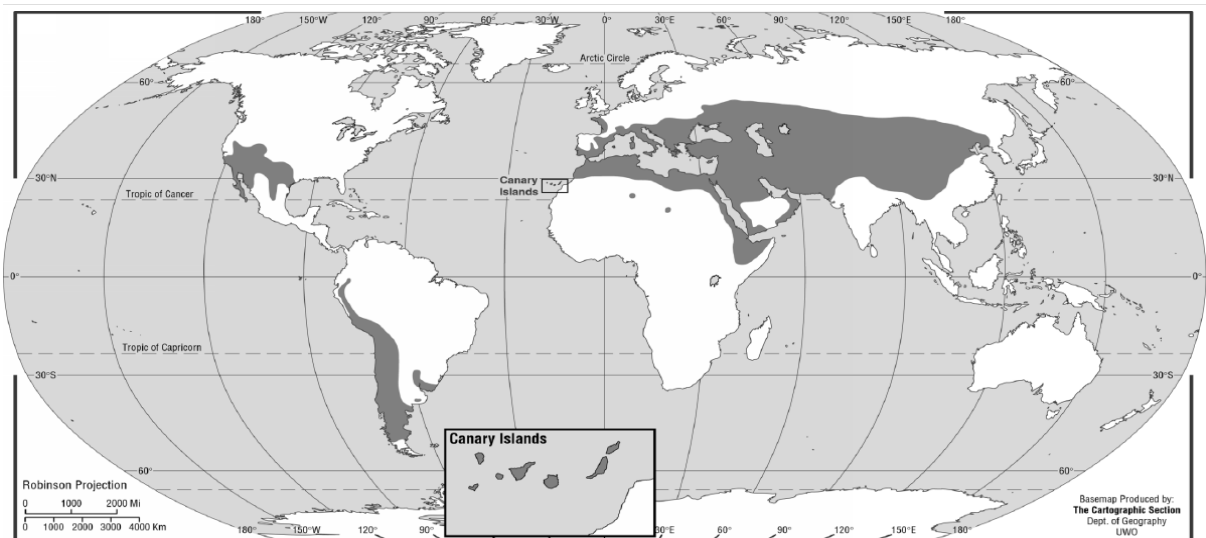


Figure 5: Répartition géographique de l'*Ephédra* dans le monde (Caveney *et al.*, 2001).

2. Sous espèce *Ephédra alata alenda*

2.1. Classification systématique d'*Ephédra alata* (Ozenda, 1991)

Embranchement : Spermaphytes
Sous embranchement : Gymnospermes
Classe : Gnetopsida
Ordre : Ephedrales
Famille : Ephedraceae
Genre : <i>Ephédra</i>
Espèce : <i>Ephédra alata</i>
Sous espèce : <i>Ephédra alata alenda</i>

2.2. Description botanique

La famille des *Ephedraceae* représentée par le seul genre *Ephédra* inclue environ 40 espèces dans le monde. L'espèce *Ephédra alata* est une plante médicinale appartenant au genre *Ephédra* originaire d'Asie, y compris l'Arabie Saoudite (Al-Qarawi *et al.*, 2011). Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Egypte et l'Arabie (Ozenda, 1991). En Algérie, *E. alata* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert (Ozenda, 1991).



Figure 6 : Photo de la plante *Ephédra alata alenda* (Ozenda, 1991)

Cette espèce, qui est réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes, est un arbuste de 1 à 3 mètres de haut, à rameaux articulés et très ramifiés d'une couleur vert-jaunâtre, portant au niveau des nœuds de petites feuilles opposées, alternant d'un nœud à l'autre (**Figure 6**). Les fleurs sont en petits cônes blanchâtres, dioïques (fleurs mâles et femelles sur des pieds différents) et les fruits entourés de bractées largement membraneuses. Elle présente un système de racines latérales extrêmement puissant (**Ozenda, 1991 ; Derbel et al., 2010**). Elle est réputée pour sa tolérance élevée à la carence en eau dans les régions sahariennes (**Ozenda, 1991 ; Derbel et al., 2010**).

2.3. Répartition géographique

L'espèce *Ephédra alata* est une plante médicinale appartenant au genre *Ephédra* originaire d'Asie, y compris l'Arabie Saoudite (**Al-Qarawi et al., 2011**). Elle est commune dans le Sahara du Maroc à la Libye jusqu'à l'Egypte et l'Arabie (**Ozenda, 1991**). En Algérie, *E. alata* se trouve dans le Sahara septentrional et occidental au niveau des terrains sableux, des regs et les lits sablonneux des oueds. Elle est même rencontrée dans le sable de l'étage tropical et la Hamada de Tinghert (**Ozenda, 1991**).

2.4. Utilisation

Les espèces du genre *Ephédra* sont parmi les plus anciennes herbes médicinales connues de l'humanité. *E. sinica* est l'espèce principale qui a été utilisée en Chine depuis plus de 5000 ans. *E. gerardiana* a aussi été utilisée dans la médecine traditionnelle indienne depuis l'ancien temps. Même durant le temps de l'empire Romain, l'*Ephedra* était bien connue (**Abourashed et al., 2003**).

Ma-huang est le terme spécifique donné, par les chinoises, à la partie aérienne des espèces contenant de l'éphédrine (**Abourashed et al., 2003**). Ma-huang a été traditionnellement utilisé en Chine pour lutter contre l'asthme bronchiale, rhume, grippe, fièvre, frissons, rhinite, congestion nasale, œdème, maux de tête, arthralgies et comme diaphorétique, antiallergique et antitussif (**Abourashed et al., 2003; Soni et al., 2004; Konno et al., 1979; Ma et al., 2007**).

Les espèces *Ephedra* d'Asie ont été récemment utilisée dans la fabrication clandestine d'une drogue de rue, de la méthamphétamine (d-desoxy-éphédrine) (**Caveney et al., 2001**).

En Asie, elle est utilisée dans la fabrication clandestine d'une drogue de rue, de la méthamphétamine (d-desoxy-éphédrine) (**Caveney et al., 2001**).

En Egypte, *E.alata* est utilisée en médecine traditionnelle comme dépurative, hypotensive, antiasthmatique et agent astringent (**Nawwar et al., 1984**).

En Arabie Saoudite, *Ephédra* est l'une des plantes de parcours les plus répandues. Elle a été utilisée comme pâturage pour de nombreux animaux attirés par son arôme acceptable (**AL-Qarawi et al., 2012**).

Au Maroc, l'*Ephédra alata* est utilisée pour lutter contre le diabète (**Ghourri et al., 2013**).

En Algérie, *E. alata* s'utilise contre la grippe, la coqueluche et la faiblesse générale en tisane et par inhalation ainsi que sous forme de gouttes nasales contre les rhumes (**Ould El Hadj et al., 2003**). Elle est très appréciée par le dromadaire.

Les organes utilisés dans la médecine traditionnelle sont les tiges vertes séchées, qui sont usuellement bouillies dans de l'eau pendant environ trente minutes et administrées comme thé chaud (**Abourashed et al., 2003**).

En dépit de sa longue histoire et sa promesse agronomique, l'utilisation de l'herbe a diminué au fil des ans, mais au début du vingtième siècle, l'importance de l'herbe a graduellement revécu comme il est démontré par son large utilisation aux Etats Unis dont beaucoup de produits contenant de l'*Ephedra* vendus sous des noms tels que "Herbal Ecstasy and Escalation" sont supposés être efficaces pour la perte de poids et l'amélioration des performances physiques (**Abourashed et al., 2003; Caveney et al., 2001**).

2.5. Pharmacologie

Les effets pharmacologiques et toxicologique de cet arbuste semble être attribuable à ses alcaloïdes de types éphédrine, principalement (-) éphédrine et (+) pseudoéphédrine. L'Ephédrine, malgré l'absence de groupement phénolique caractéristique des catécholamines, est un sympathomimétique, agoniste à la fois des récepteurs adrénergiques

α et β . Elle présente aussi un effet indirecte sur le système sympathique via l'augmentation de la libération de noradrénaline à partir des vésicules de stockage dans les neurones sympathiques vers la zone synaptique où il se fixe sur les récepteur post-synaptiques α et β (Limberger *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2007).

L'effet principal de la stimulation des récepteurs adrénergiques α et β inclue l'augmentation de la fréquence cardiaque et la contractilité. Elle favorise également la vasoconstriction périphérique due à la fraction pseudoéphédrine, la bronchodilatation, ce qui explique son utilisation traditionnelle comme décongestionnant nasal et antiasthmatique, ainsi que la stimulation du SNC (Abourashed *et al.*, 2003 ; Phinney *et al.*, 2005). Cependant, les effets hypertenseurs et vasoconstricteurs liés à l'éphédrine, sont moins rapides et moins puissants, mais plus durables et plus stables dans les conditions du métabolisme contrairement à l'adrénaline (Chopra *et al.*, 1960). C'est pour cela que l'administration de l'éphédrine, qui semble le majeur principe actif de la plupart des espèces *Ephédra*, est contre indiqué chez les patients atteint d'hypertension ou toute autre MCV, de glaucome, ou de l'hyperthyroïdie (Soni *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2010).

2.6. Toxicologie

Les espèces de l'*Ephédra* ont des effets bénéfiques et néfastes (Ma *et al.*, 2007). Cliniquement, il peut en résulter une tachycardie, une hypertension, une hypersudation, une bronchodilatation, une agitation et une mydriase. L'utilisation de l'*Ephédra* est également connue pour être associée avec des manifestations gastro-intestinales et psychiatriques (Peters *et al.*, 2005). Ces effets peuvent être les raisons pour lesquelles l'utilisation de l'*Ephédra* est recommandée uniquement pour les situations aiguës en médecine traditionnelle chinoise et contre-indiqué pour une utilisation à long terme (Chen *et al.*, 2010).

2.7. Travaux antérieurs

2.7.1. Activités biologiques de la plante

✓ Activité antimicrobienne

Ephédra alata s'est révélée avoir une activité antivirale élevée contre le HSV (Herpès simplex virus) (Mohamed Soltan et Kamal Zaki, 2009). L'extrait aqueux de *E. alata* égyptienne présente un potentiel d'inhibition significatif in vitro et in vivo contre la croissance et la production d'aflatoxines par *Aspergillus flavus* (Al-Qarawi *et al.*, 2011). Ghanem et El-Magly. (2008) ont montré que l'extrait acétonitrile de l'*E.alata* de l'Egypte

présente simultanément, une forte activité contre des bactéries à GRAM+ et à GRAM- ainsi que des champignons et champignons de type levure. *L'E.alata* de la région d'Ouargla testé par **Kessal et Bouafia**. (2003) et s'est révélée avoir des activités plus ou moins importantes sur la croissance de bactéries à GRAM positif et à GRAM négatif selon la souche ciblée.

✓ **Effet sur la masse corporelle**

Une étude réalisée par **Boozer et al.** (2001) a montré qu'un mélange d'*Ephédra* et de guarana favorise efficacement et à court terme (8 semaines) la perte de poids chez des sujets en surpoids. Un tel effet a été principalement attribué à une augmentation de la tonicité sympathomimétique entraînant une augmentation de la lipolyse et la glycogénolyse, avec la stimulation sympathique du centre de la satiété central conduisant à la suppression de l'appétit.

✓ **Effet hypoglycémiant**

Cinq glycanes actifs isolés de *E.distachya*: Ephedranes A, B, C, D et E ont réduit significativement le taux de glucose sanguin chez des souris normales et diabétiques (**Konno et al., 1985**). Ainsi que l'extrait alcoolique de *l'E.alata* a présenté un abaissement persistant du taux de glucose sanguin une heure après son administration à des rats à jeun (**Shabana, 1990**).

✓ **Effet anti-inflammatoire**

L'extrait aqueux de *l'E.sinica* présente une propriété inhibitrice de complément à la fois dans le sérum animal et humain. Ceci pourrait expliquer l'utilisation de la plante dans la médecine chinoise traditionnelle dans le cas de néphrite aigue (**Ling et al., 1995**). Par ailleurs, **Hikino et al.** (1980) ont suggéré que la pseudoéphédrine est le principe actif responsable de l'activité anti-inflammatoire montrée par *l'E.intermedia*. **Konno et al.**(1979) ont rapporté que la partie aérienne des espèces d'*Ephédra* contient de l'Ephedroxane qui s'est révélée également posséder une activité anti-inflammatoire.

✓ **Action sur la pression artérielle**

Les croyances chinoises prétendent que la partie aérienne et souterraine de *l'Ephédra* ont des effets opposés. Cela a été confirmé, pour l'action sur la pression artérielle, par des tests sur des animaux. Un polyphénol nommé l'Ephedrannine A isolé à partir des racines de la plante (**Hikino et al., 1982**) ainsi qu'un type mineure d'alcaloïdes

dans la plante isolé de ses racines, nommé l'Ephedradine, présentaient un effet hypotensif (Tamada *et al.*, 1979). Par contre, l'éphédrine présente une action hypertensive (Ehab *et al.*, 2003).

2.7.2. Chimie de la plante

Les espèces d'*Ephédra* sont des sources naturelles de nombreux phytoconstituants incluant des alcaloïdes, des tanins (principalement les proanthocyanidines), des saponines des acides phénoliques, des flavonoïdes (la vicénine II, la leucine III, le kaempferol 3-rhamnoside, la quercétine 3 - rhamnoside et l'herbacétine 7-O-glucoside sont les flavonoïdes qui ont été isolés de l'*Ephédra alata*), et des huiles essentielles (Hegazi et El-Lamey, 2011).

Il est bien connu dans la littérature que les propriétés biologiques traditionnelles de l'*Ephédra* sont attribuables en grande partie aux alcaloïdes de type éphédrine, proto-alcaloïdes dérivés de la phénylalanine (Caveney *et al.*, 2001). Notons que la (-) éphédrine et l'(+)-pseudoéphédrine sont généralement les plus abondantes, ils représentent environ 80% de la teneur en alcaloïdes dans la plante séchée (Phinney *et al.*, 2005; Soni *et al.*, 2004; Caveney *et al.*, 2001).

Plus de 50 espèces d'éphédra sont originaires de deux hémisphères, mais la détection des alcaloïdes de la série de l'éphédrine a été limitée à des espèces en Eurasie dont l'*Ephédra sinica* est la principale source, tandis que les espèces américaines telle que *E. nevadensis* connue comme Mormon ou le thé de désert sont considérées comme dépourvues de ces métabolites (Limberger *et al.*, 2013; Abourashed *et al.*, 2003).

Néanmoins, ce type d'alcaloïdes ne représente pas les seuls alcaloïdes identifiés dans la plante. Il existe d'autres types d'alcaloïdes mineurs isolés à partir de différents espèces d'*Ephédra*.

- **Flavonoïdes**

Les flavonoïdes des espèces de l'*Ephédra* comprennent principalement des di-Cglycosylflavones, flavonol-3-O-glycosides et proanthocyanidines (Nawwar *et al.*, 1984). Le flavonoïde glycosylé, herbacétin 7-O-neohesperidoside ainsi que plusieurs autres flavonoïdes tels que le symplocoside, la pollenitine B, le kaempferol 3-O-rhamnoside 7-Oglucoside et l'isovitexine 2-O-rhamnoside ont été identifiés à partir de l'extrait de l'espèce *Ephédra sinica* par Amakura *et al.* (2013). L'herbacétine 8-méthyl ether 3-O-glucoside-7-O-rutinoside, l'herbacétine 7-O-(6''- quinyglucoside), la vicénine II, la

lucenine III, le kaempferol 3-rhamnoside, la quercétine 3- rhamnoside et l'herbacetine 7-O-glucoside sont les flavonoïdes qui ont été isolés et identifiés de l'*Ephédra alata* (la plante entière). Aussi, l'herbacetin 7-O-glucoside a été rapporté dans l'espèce *E. lomatolepis* et l'herbacetine 8 methylether 3-O-glucoside de *E. equisetina* (**Nawwar et al., 1984**).

- **Tanins**

Les tanins, principalement les proanthocyanidines, ont été caractérisés par des réactions colorimétriques. Ces composés sont produits en grande quantité dans les tiges de nombreuses espèces *Ephédra* appartenant aux deux continents, eurasiens et américains (**Zang et al., 2013**). Ces molécules contribuent au goût astringent de l'*Ephédra* (**Soni et al., 2004**).

- **Huiles essentielles**

Les principaux constituants de l'huile essentielle d'*E. Sinica* signalés par **Miyazawa et al.** (1997) et **Wang et al.** (2006) sont l' α -terpinéol, le terpinen-4-ol, le linalool, le 2,3-dihydro-2- méthylbenzo-furanne, le cis-p-menth-2-ène-7-ol., le p-vinylanisole, le 3-méthyl-2-butén-1-ol, le phytol et le γ -eudesmol. En plus du tétraméthylpyrazine, qui a été approuvé ultérieurement comme alcaloïde (**Hong-Xia Li et al., 2001**).

1. Matériel biologique

1. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé correspond la partie aérienne composée des rameaux et des feuilles de la plante achetée de L'espèce *Ephédra alata alenda* (**Figure 8**).

La récolte *Ephédra alata alenda* est effectuée au mois d'automne (2018) au niveau de la région d'Ouargla Elle est située dans le sud-est de l'Algérie, au nord du Sahara algérien. Elle se situe à 190 km à l'est de Ghardaïa, 160 km au sud-ouest de Touggourt, 388 km au sud de Biskra. (**Figure 7 ; Tableau 1**). Pour assurer la bonne conservation de notre plante, le séchage est fait à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité afin d'éviter la dégradation des principes actifs et le développement des moisissures (**Catier et Roux, 2007**).Après séchage, les tiges ont été broyées par un broyeur électrique et stockées dans un endroit sec en vue de leurs analyses.

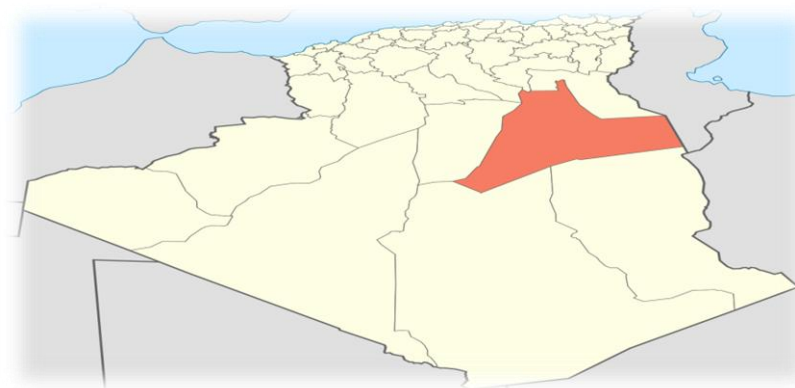


Figure 7 : Localisation de la Wilaya d'Ouargla

Tableau 1 : Paramètres géographiques et bioclimatiques de la région d'Ouargla

Plante étudiée	Station	Période de récolte	Partie étudiée	Latitude	Altitude (m)	Etage bioclimatique
<i>Ephédra alata alenda</i>	Ouargla	Novembre 2018	Partie aérienne	31° 57' 10" Nord latitude et 5° 19' 54" Est longitude	157 m	Climat désertique



Figure 8 : Aspect morphologique de l'espèce *Ephédra alata alenda*

1.2. Matériel animal

L'étude de l'activité anti-inflammatoire est réalisée sur des souris femelles de la souche albinos Wistar dont pesant 30 ± 5 g, fournies par l'Institut Pasteur d'Alger. Ces animaux sont élevés au niveau de l'animalerie de l'université de Guelma Les souris ont été réparties en 5 lots homogènes de 5 souris Hébergées dans des cages de polypropylène à une température ambiante, avec accès libre aux aliments et de l'eau. Après une période d'adaptation, les souris sont pesées et marquées avant leur utilisation.

2. Méthodes

2.1. Screening phytochimique

Des tests en tube sont réalisés sur les poudres végétales afin de déterminer de manière préliminaire les classes phytochimiques contenues dans la plante analysée. Il s'agit d'une analyse qualitative basée sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ainsi qu'à des examens en lumière ultraviolette.

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques.

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes, les glycosides ...etc.

2.1.1. Test des alcaloïdes

Le réactif de Mayer

- Réactif de Mayer composition :

Iodure de potassium (KI) 25 g, chlorure mercurique(HgCl_2) 6,8 g, eau distillée (1000 ml).

Une pesée de 10g de plante, mise en poudre, est pesée puis mélangée à 50 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est ensuite filtré puis lui ajouté NH_3 jusqu'à un pH: 8 à 9, on a fait ensuite l'extraction par CHCl_3 (3 fois), on évapore CHCl_3 , on ajoute à l'extrait sec 2 ml HCl (1%), puis 3 gouttes de réactif de Mayer. L'apparition de précipité blanc ou une phase trouble indique la présence des alcaloïdes (**Benzahi et al., 2001**).

2.1.2. Test des saponosides

Deux gramme de poudre de la plante est mélangé à 80 ml d'eau distillée puis porté à l'ébullition pendant 5 minutes. Ensuite l'extrait est filtré puis refroidi suivis d'une agitation vigoureuse pendant 2 minutes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de saponosides (**Benzahi et al., 2001**).

2.1.3. Test des flavonoïdes

Dix grammes de plante, mise en poudre, est pesée puis mélangée à 100 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est macéré durant 24 h, après filtration on ajoute NH_4OH au filtrat jusqu'à la basicité. L'apparition d'une couleur jaune claire implique la présence des flavonoïdes (**Benzahi et al., 2001**).

2.1.4. Test des coumarines

On évapore 10 ml de l'extrait Ether di éthylique, l'extrait sec est repris dans 2 ml d'eau. Le mélange obtenu est ensuite partagé dans deux tubes à essais (l'un servira de référence). Au contenu de l'autre, nous avons ajouté 0.5 ml de NH_4OH (10 %). Nous avons bien mélangé et observé la fluorescence sous UV. La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence dans le tube (**Benzahi et al., 2001**).

2.1.5. Test des stérols et triterpènes

Une pesée de 5g de plante, mise en poudre, a été mise dans 20 ml de chloroforme. Après filtration la solution obtenue est répartie entre deux tubes à essais (l'un servira de référence). On ajoute d'abord anhydride d'acétate (Ac_2O) ; ensuite nous avons ajouté 1ml

d'H₂SO₄ au fond du tube sans agiter. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageant révèlent la présence des stérols et des triterpènes. C'est la réaction de Liebermann-Buchard (**Benzahi et al., 2001**)

2.1.6. Test des Tanins

10 g de plante, mise en poudre, on extrait par l'alcool éthylique 50%, puis on filtre, on a ajouté au filtrat quelques gouttes FeCl₃ (1%). En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre (**Benzahi et al., 2001**).

2.1.7. Test des glycosides

Cinq grammes de plante, mise en poudre, on y ajoute 50 ml d'une solution de l'acide tartrique 2 % dans l'éthanol, on chauffe à reflux durant 2 h, après filtration et lavage par l'éthanol, on met le filtrat dans l'eau chaude. Dans un tube à essai, on ajoute à 2 ml du filtrat 2 gouttes de la liqueur de Fehling, on chauffe, la réduction de la liqueur de Fehling montre la présence des glycosides (**Chaouch, 2001**).

La présence des principales classes phytochimiques est classée comme suit :

+ : présence certaine.

- : absence.

2.2. Préparation de l'extrait brut aqueux par Extraction Solide - Liquide (ESL) :

Dans cette partie de travail, nous avons tenté d'extraire les composés phénoliques totaux. Une quantité de poudre végétale est mise en contact avec l'eau chaude (Infusé) pour se rapprocher des préparations traditionnelles.

Le volume de l'eau doit être suffisant pour que la matrice reste immergée pendant la totalité de l'extraction.

Une posée de 250g de la poudre végétale a été placées avec 2 litres de l'eau distillé dans un cristalliseur. Le mélange a été laissé sur l'agitateur environ 3 heures jusqu'à la bouillir. Après refroidissement le mélange est filtrés par le coton, puis par le papier filtre. Le filtrat est concentré au rotavapeur.

2.3. Détermination de la teneur en composés phénoliques (TCP)

Les analyses quantitatives des polyphénols totaux et des flavonoïdes des différents extraits sont déterminées à partir des équations de la régression linéaire des courbes d'étalonnage et exprimées en mg équivalent par g de la matière végétale sèche. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés anti-inflammatoires, anti oxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribués.

2.3.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux (TPT)

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait brut aqueux a été déterminée au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu suivant la méthode décrite par **Awah** et ses collaborateurs (2012). Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (**Ribéreau-Gayon et al., 1972**). L'intensité de cette couleur renseigne sur le contenu en polyphénols totaux dans le mélange.

Une prise de 125 μ l de l'extrait dilué est mélangée avec 500 μ l d'eau distillée et 125 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3 minutes, une prise de 1250 μ l de $CO_3(Na)_2$ à 7 % est additionnée. Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3 ml. Après un repos de 90 minutes à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 725 nm.

La gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique à des concentrations variables de 10, 25, 30, 50, 75, 100 μ g/ml. Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mgEAG/gMS) (**Figure 9**).

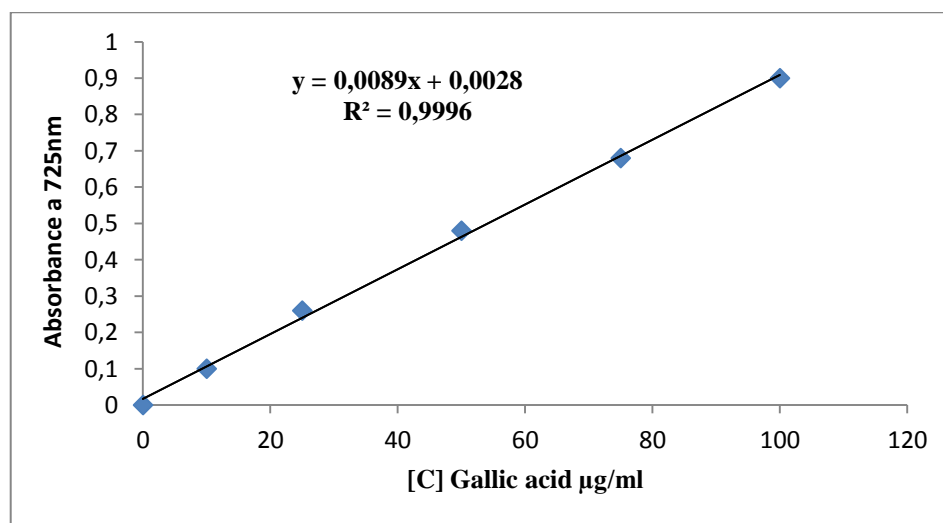


Figure.9 : Courbe étalon de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

2.3.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux :

La teneur en flavonoïdes totaux d'extrait brut déterminée selon la méthode au trichlorure d'aluminium décrite par **Barros et al.** (2011). Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des flavonoïdes par le trichlorure d'aluminium et la soude, entraînant ainsi la formation d'un complexe rose qui absorbe à 510 nm.

Une prise de 500 µl d'extrait convenablement dilué est mise dans un tube en présence de 2 ml d'eau distillée additionnée de 150 µl d'une solution de nitrite de sodium (NaNO₂, 5%). Après 6 mn d'incubation à température ambiante, 150 µl d'une solution fraîchement préparée de chlorure d'aluminium (AlCl₃, 10%) sont ajoutés au mélange. On apporte à ce dernier 2 ml d'une solution de soude (NaOH, 4%) après 6 mn de repos puis on ajuste le volume final à 5 ml avec de l'eau distillée. L'intensité de la couleur rose est mesurée à 510 nm après 15 min d'incubation. Une gamme étalon à base de catéchine est également préparée dans les mêmes conditions(**Figure10**).

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits est alors exprimée en mg d'équivalents catéchine par gramme de matière végétale sèche (mg EC/g MS).

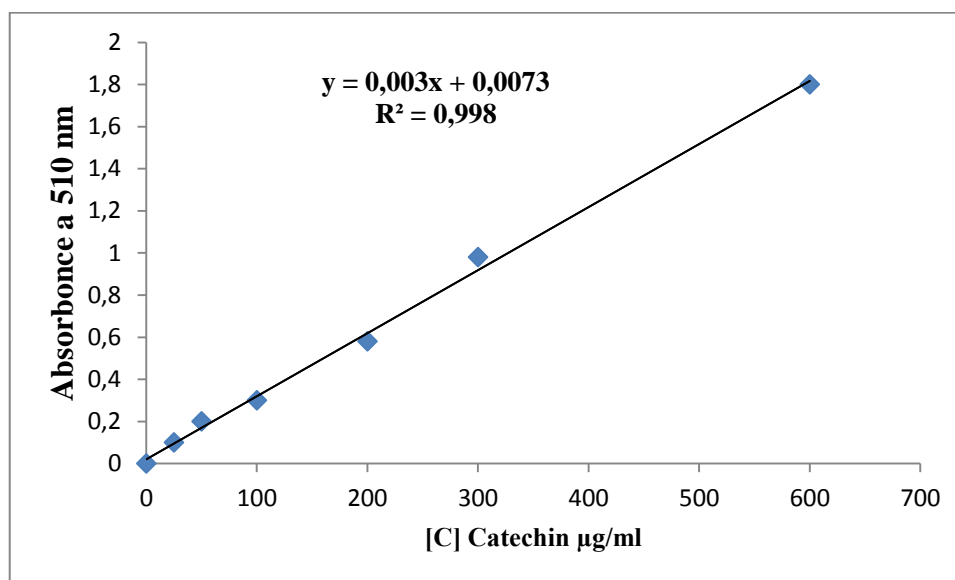


Figure.10 : Courbe étalon de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

3. Evaluation de l'activité anti inflammatoire *in vitro* :

3. 1. Inhibition de la dénaturation des protéines :

La dénaturation des protéines est la conséquence de la réaction inflammatoire (Barros *et al.*, 2010). Le modèle de la dénaturation de l'albumine a été choisi pour évaluer les propriétés anti-inflammatoires *in vitro* de l'extrait aqueux d'*éphédra alata alenda* selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (Ghosh *et al.* 2015).

Le principe de cette technique est basé sur la capacité de l'extrait à empêcher la dénaturation faisant suite à un traitement thermique de l'albumine bovine.

La méthode consiste a préparé quatre solution :

- **Solution d'essai (0,5 ml)** composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de sérum bovine albumine (BSA) 0,5% w/v et 0,05 ml de différents extraits de la plante avec des concentrations varier (500, 1000, 1500,µg/ml).
- **Solution contrôle (0,5 ml)** composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 0,5% w/v et 0,05 ml d'eau distillé.
- **Solution contrôle produit (0,5 ml)** composé de 0,45 ml d'eau distillé et 0,05 ml de différents extraits de la plante avec des concentrations variées (500, 1000, 1500, µg/ml).
- **Solution standard (0,5 ml)** composé de 0,45 ml de la solution aqueuse de BSA 0,5% w/v et 0,05 ml de la solution standard Diclofénac sodium avec des concentrations variées (500, 1000, 1500µg/ml).

Les échantillons ont été incubées à 37 °C pendant 20 min, ensuite la température était augmenté jusqu'à 57 °C pendant 3 min. Après refroidissement des tubes, 2,5 ml de la solution phosphate buffer saline (PH 6,3) a été ajouté aux solutions (Ghosh *et al.*, 2015).

L'absorbance a été lue par spectrophotomètre UV-visible à 255 nm.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation de protéine été calculée comme suit:

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [100 - (A_{\text{solution d'essai}} - A_{\text{contrôle produit}} / A_{\text{solution contrôle}})] \times 100$$

Le contrôle représente 100% des protéines dénaturées."

3.2. Stabilisation de la membrane des globules rouges humains :

L'activité anti inflammatoire *in vitro* de l'extrait d'*Ephédra alata alenda* a été effectuée selon la méthode de stabilisation de la membrane des globules rouges humain après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique (Habibur *et al.*, 2015)

➤ Préparation des réactifs Alsevers solution

2 g dextrose, 0,8 g citrate de sodium, 0,05 g d'acide citrique et 0,42 g chlorure de sodium ont été dissous dans l'eau distillée. Le volume final a été préparé jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée.

- **Saline hypotonique**

0,36 g chlorure de sodium dissous dans 100 ml d'eau distillée.

- **Saline isotonique**

0,85 g chlorure de sodium dissous dans 100 ml d'eau distillée.

- **Tampon phosphate (pH 7,4 ; 0,15 M)**

2,38 g d'hydrogène phosphate di sodium, 0,19 g de dihydrogène phosphate de potassium et 8 g chlorure de sodium ont été dissous dans 100 ml d'eau distillée.

- **Préparation de la suspension des globules rouges humains**

Un échantillon de sang frais a été récupéré dans des tubes héparinisés, à partir du laboratoire d'analyses médicales du ibn zohr de la région de Guelma, où la prise de sang a été effectuée sur un volontaire humain (29 ans) n'ayant pas pris de médicaments anti-inflammatoires, durant les deux dernières semaines avant le prélèvement, et a été mélangé avec un volume égal de la solution Alsevers stérilisée. Cette solution de sang a été centrifugée à 3000 tr / min à 10 min et les hématies ont été séparées et a été lavées avec une solution d'isosaline, une suspension à 10% v/v a été préparée avec de l'isosaline (Habibur *et al.*, 2015).

Les solutions suivantes ont été utilisées :

- **Solution d'essai :** composé de 1 ml tampon phosphate, 2 ml solution saline hypotonique, 0,5 ml d'extrait végétal de concentration variée (500, 1000 et 1500 µg / ml) et 0,5 ml des globules rouges humains à 10% (v/v).

- **Solution contrôle** : composé de 1 ml de tampon phosphate et 2 ml d'eau et 0,5 ml de globules rouges humains 10% (v/v) dans une solution saline isotonique.
- **Solution standard** : composé de 1 ml de tampon phosphate, 2 ml de solution salée hypotonique, 0,5 ml d'extrait végétal de concentration variée (500, 1000 et 1500 µg / ml) et 0,5 ml des globules rouges humains à 10% v/v.

Incubés de tous les mélanges d'essai à 37 ° C pendant 30 min. puis centrifugé à 3000 tr / min pendant 20 min. Le liquide surnageant a été séparé et la teneur en hémoglobine a été estimée par un spectrophotomètre à 560nm. Le pourcentage d'hémolyse a été estimé en supposant que l'hémolyse produite dans le contrôle était 100% (Suresh *et al.*, 2014). Le pourcentage de stabilisation ou de protection de la membrane HRBC a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de protection} = [100 - (A_{\text{solution d'essai}} / A_{\text{solution Contrôle}})] \times 100$$

4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo*

Pour étudier l'activité anti inflammatoire de la plante, l'œdème est provoqué par l'injection dans l'aponévrose une solution de formol à 3%, Selon laquelle l'inflammation est induite par injection de formol au niveau de la voûte plantaire de la patte du souris. L'œdème causé par cet agent photogène sera traduit en volume et mesuré par un pied à coulisse digital ce qui permet de suivre l'évolution du processus inflammatoire pour chaque essai de l'activité anti-inflammatoire. Cinq lots de 5 souris ont été utilisés. Les souris ont été mis à jeun 12 heures avant l'essai (Winter *et al.*, 1962).

4.1. Prétraitement par l'extrait

Une demi-heure avant l'injection du formol, un effectif de 25 souris est divisé en 5 lots, chaque lot reçoit par voie intra-péritonéale (i.p) (Figure11). Les solutions expérimentales comme suit :

- **Lot témoin sain (n=5)** : une solution de NaCl (0.9%)
- **Lot contrôle (n=5)** : une solution de formol (0.9%)
- **Lot standard (n=5)** : anti-inflammatoire diclofénac (25 mg/Kg) dissous dans l'eau distillé.

- **Lot essai (n=5)** : l'extrait aqueux d'*Ephédra alata alenda* a la dose de 150 mg/Kg de PC dissous dans l'eau distillé.
- **Lot essai (n=5)** : l'extrait aqueux d'*Ephédra alata alenda* a la dose de 300 mg/Kg de PC dissous dans l'eau distillé.



Figure11 : Administration de l'extrait aqueux d'*Ephédra alata alenda* par voie intrapéritonéale.

4.2. Induction de l'inflammation

L'inflammation causée sera diminuée en présence de l'extrait ayant une activité anti-inflammatoire (**Winter et al., 1962**).

Une demi-heure après l'administration de traitement, chaque animal reçoit par injection au niveau de la voûte plantaire de la patte droite du souris 300µl d'une suspension de formol à 3% dissous dans l'eau distillée (**Figure12**).



Figure12 : Injection subplantaire du formol dans la patte arrière droite

4.3. Évaluation de l'activité anti-œdémateuse

Le suivi de l'évolution de l'œdème se fait par mesure du diamètre de la patte à l'aide d'un pied à coulisse(Figure13), et ceci à 0, 30, 60, 120 et 180 mn après injection du formol.



Figure 13 : Mesure du diamètre de gonflement de la patte.

L'importance de l'œdème a été appréciée par la détermination du pourcentage d'augmentation du volume de la patte et l'activité anti-inflammatoire des produits testés et son évolution ont été évaluées grâce au calcul du pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème.

Ces moyennes sont reportées sur une courbe permettant de suivre l'évolution de l'œdème pour chaque lot.

➤ **Pourcentage d'augmentation du volume de la patte (%AUG)**

Le pourcentage d'augmentation (%AUG) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris. Il est donné par la formule suivante (Ossipov *et al.*, 1995):

$$\%AUG = (D_n - D_0) / D_0 \times 100$$

D_n : diamètre de la patte l' n ième heure après l'injection du formol

D_0 : diamètre de la patte avant l'injection du formol.

➤ **Pourcentage d'inhibition de l'œdème (% INH)**

Le pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème est calculé pour chaque groupe de souris traitées par rapport au lot témoin. Il est obtenu par la formule suivante (Ossipov *et al.*, 1995):

$$\%INH = (\%AUG_{\text{témoin}} - \%AUG_{\text{traité}}) / \%AUG_{\text{témoin}} \times 100$$

4.4. Taux des cellules immunitaire (leucocytes, lymphocytes, granulocytes)

Taux de globules blancs est calculé par la technique d' FNS (Formule Numération Sanguine). FNS est l'analyse des composants du sang. Elle est demandée couramment comme un outil permettant le diagnostic ou l'orientation de celui-ci.

4.5. Analyses statistique

Les résultats des tests effectués in vivo sont exprimés en Moyenne \pm Sd par un logiciel (Graph Pad. Prism. V 7.03). La différence entre le contrôle et les différentes doses est déterminée par le test one wayANOVA pour les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05 ($p < 0.05$).

I. Résultats

1. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur la poudre de la partie aérienne de *Ephedra alata alenda*, en utilisant des solvants de polarité différente et des réactifs spécifiques de révélation.

Le screening phytochimique a pour objectif de détecter les principaux métabolites secondaires existants dans *EAA* via une analyse qualitative des réactions de coloration spécifique, précipitation, turbidité, des essais de solubilités des constituants et l'utilisation des techniques de fluorescences (examen sous la lumière ultraviolette).

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques, montrent la présence des alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les saponosides, des coumarines, des stérols et terpènes au niveau de la partie aérienne de la plante.

- La mise en évidence des flavonoïdes a été confirmée par l'apparition d'une couleur rouge intense en contact avec la tournure de magnésium.
- La caractérisation des tanins avec une intensité importante a été faite par la réaction avec une solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleu-verdâtre, il s'agit donc des tanins catéchiques.
- Le test positif des stérols et triterpènes indique leur présence par l'apparition d'un anneau rouge brun et un surnageant de couleur verte s'est fait grâce à la réaction de Liebermann -Buchard.
- L'apparition d'une fluorescence sous une lumière ultra-violette indique la présence des coumarines à une grande intensité.
- La recherche des saponosides a été prouvée par la formation de mousse après agitation
- la présence des glycosides avec une quantité importante
- La détection des alcaloïdes est révélée par l'apparition de précipité blanc grâce au réactif de mayer

Les tests phytochimiques dont la précision reste quand même limitée, ne nous renseignent pas sur la structure d'une molécule bien déterminée. Néanmoins, ils permettent de détecter la présence ou l'absence de telle ou telle famille chimique.

Les travaux antérieurs sur les tests phytochimiques d'*éphédra alata alenda*, ont démontré la présence des alcaloïdes des flavonoïdes, des polyphénols, des tanins (catéchiques) des stérols, triterpènes, saponosides et des coumarines (**Kebili, 2016**) ce qui est comparable à nos résultats *Ephédra alata* de la région d'Ouargla présente une richesse en métabolites secondaires, la plupart de ces résultats sont conformes à ceux de **Kessal et Bouafia (2003)** sur la même espèce récoltée de la région d'Ouargla, L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologiques remarquables (**Konkon et al., 2006**). Ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour lesquelles elle est utilisée en tradithérapie.

La nature des principes chimiques mise en évidence par le criblage phytochimique laisse prévoir des activités pharmacologiques intéressantes des plantes étudiées. Il s'agit essentiellement :

- ✓ **Des flavonoïdes** : souvent présentés comme anti-inflammatoires, anti-allergiques, hépatoprotecteurs, antispasmodiques, hypocholestérolémiants, diurétiques, antibactériens, antiviraux *in vitro*... (**Bruneton, 2009**).
- ✓ **Des tanins** : les applications des drogues à tanins sont assez restreintes et découlent de leur affinité pour les molécules protéiques. Par voie externe, elles imperméabilisent les couches les plus externes de la peau et des muqueuses, protégeant ainsi les couches sous-jacentes ; elles ont aussi un effet vasoconstricteur sur les petits vaisseaux superficiels. Par voie interne, ils exercent un effet anti diarrhéique certain. Quelle que soit la voie d'administration, l'effet antiseptique, antibactérien et antifongique clairement démontré de ces molécules est intéressant (diarrhée infectieuses, dermatites) (**Bruneton, 2009**).
- ✓ **Des saponosides** : sont habituellement hémolytiques. Cette propriété est attribuée à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire. Il est également assez fréquent que ces molécules aient une très forte activité spermicide, logiquement corrélée avec l'activité hémolytique. In vivo, bon nombre de saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique. Quasiment dépourvus

d'activité antibactérienne, les saponosides sont parfois actifs, in vitro, sur des virus (Bruneton, 2009).

2. Détermination de la teneur en composés phénoliques

2.1. Détermination de la teneur en polyphénols totaux(TPT), en flavonoïdes totaux(TFT)

La quantification des polyphénols des extraits de *E.alata alenda*, obtenus par macération par l'eau chaude, avec la méthode de Folin-Ciocalteu a conduit aux résultats illustrés par la figure 14 d'où l'on déduit les teneurs en CPT de l'extrait aqueux exprimées en mg EAG/g d'extrait à partir de l'équation de régression (Figure 9)

Selon les résultats montrés dans la figure14, on a observé que la teneur en polyphénols totaux dans l'infusé d'éphédra *alata alenda* est estimée par 69.01 mg EqAG/g MS.

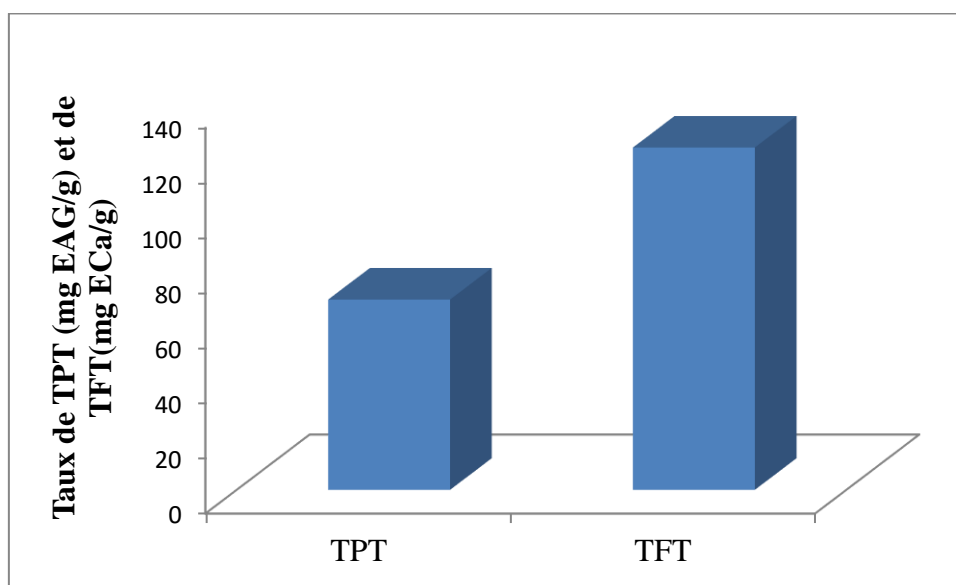


Figure 14 : Teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes totaux de l'extrait brut aqueux d'éphédra *alata alenda*. Les valeurs représentent les Moyennes \pm sd. (n=3).

Les extraits polaires sont les plus riches en composés phénoliques totaux, Ce résultat est à l'instar d'autres plusieurs études. Par exemple ; **Moure et al.** (2001) dans leurs travaux sur *Gevuina avellana hulls* trouvent que le rendement de l'extraction des polyphénols était plus élevé pour les solvants les plus polaires.

Les extraits méthanoliques (MeOH à 90%) de la partie aérienne de 3 espèces d'*Ephédra* iranienne ; *E. procera*, *E. pachyclada* et *E. strobilacea* ont montré une teneur plus faible que celle estimée dans notre étude. Ces valeurs étaient de 46.68, 31.93 et 36.56 mg EAG/ g d'extrait respectives par rapport à 94.66 ± 3.23 mg EC/ g d'extrait méthanolique de la partie aérienne de notre plante (**Parsaeimehr et al., 2010**). Par ailleurs, l'extrait méthanolique (MeOH 80%) de *Ephédra sinica* chinoise a montré une teneur très faible en polyphénols totaux 27.70 ± 0.89 mg EAG/g (**Song et al., 2010**).

Le stress environnemental, sécheresse, pauvreté de sol en nutriments ainsi que le fort ensoleillement, contribuent à l'augmentation du niveau de la production des composés phénoliques dans certaines plantes (**Timmerman et al., 1984**). Ce qui explique la richesse de *Ephédra alata alenda* de notre région saharienne en composés phénoliques par rapport aux autres espèces d'*Ephédra* dans le monde.

2.2. Teneur en flavonoïdes totaux (TFT)

La quantification des flavonoïdes des extraits d'*E. alata alenda*, obtenus par macération dans les solvants de polarité croissante avec la méthode du trichlorure d'aluminium. Nous avons pu quantifier ainsi les flavonoïdes d'extrait brut aqueux exprimés en mg EC/g d'extrait à partir de l'équation de régression (**Figure 10**).

Un taux de 124.23 mg Eq Ca /g MS a été enregistré des flavonoïdes totaux de l'infusé de la plante étudiée (**Figure 14**).

Selon **kebili** et ses collaborateurs (2016) Les extraits apolaires se sont avérés les plus riches en flavonoïdes. Un résultat similaire est obtenu par **Hammoudi** (2015) pour l'extrait d'hexane de *Salvia chudaei* et l'extrait chloroformique de *Tecrium polium* qui ont présenté des teneurs plus élevées en flavonoïdes comparativement aux extraits plus polaires. L'extrait moyennement polaire AcOEt de la partie aérienne a quant à lui présenté une teneur comparable à celle de l'extrait DCM de la partie aérienne. Selon **Bruneton** (1999), les génines sont, pour la plupart, solubles dans les solvants organiques apolaires.

Les lipophiles des tissus superficiels des feuilles (ou des frondes) sont directement extraits par des solvants moyennement polaires (dichlorométhane). Les flavonoïdes glycosylés et les aglycones plus polaires sont extraits avec les alcools ou avec un mélange alcool/eau. Ce là pourrait expliquer que les flavonoïdes extraits de *E. alata alenda* par cette

méthode, et qui se concentrent surtout dans les extraits apolaires, sont probablement surtout des formes libres, aglycones.

Vundać et al. (2007) ont constaté l'absence de corrélation entre la teneur des polyphénols totaux et celle des flavonoïdes des différents extraits de 7 espèces de *Stachys*. Aussi Athamena et al. (2010) n'ont pas trouvé une corrélation entre les teneurs des polyphénols et des flavonoïdes des extraits du cumin. Dans la littérature, il n'est pas rare de trouver des teneurs en flavonoïdes supérieures à celles des polyphénols totaux (Ayoola et al., 2008; Athamena et al., 2010; Hammoudi, 2015). Cela peut s'expliquer probablement par le fait que les deux méthodes de dosage utilisées Folin-Ciocalteu et trichlorure d'aluminium ne sont pas spécifiques et qu'ils peuvent donner des résultats peu exacts en réagissant avec d'autres composés y compris les protéines, sucres, amines aromatiques .etc (Prior et al., 2005; Chebrouk, 2009) en plus de la différence des unités d'expression des résultats.

3. Activité Anti-inflammatoire in vitro

3.1. Inhibition de la dénaturation du BSA

Selon Rathisre et al., (2013), la méthode de la dénaturation protéique est la plus convenable pour l'évaluation *in vitro* de l'activité anti inflammatoire des extraits.

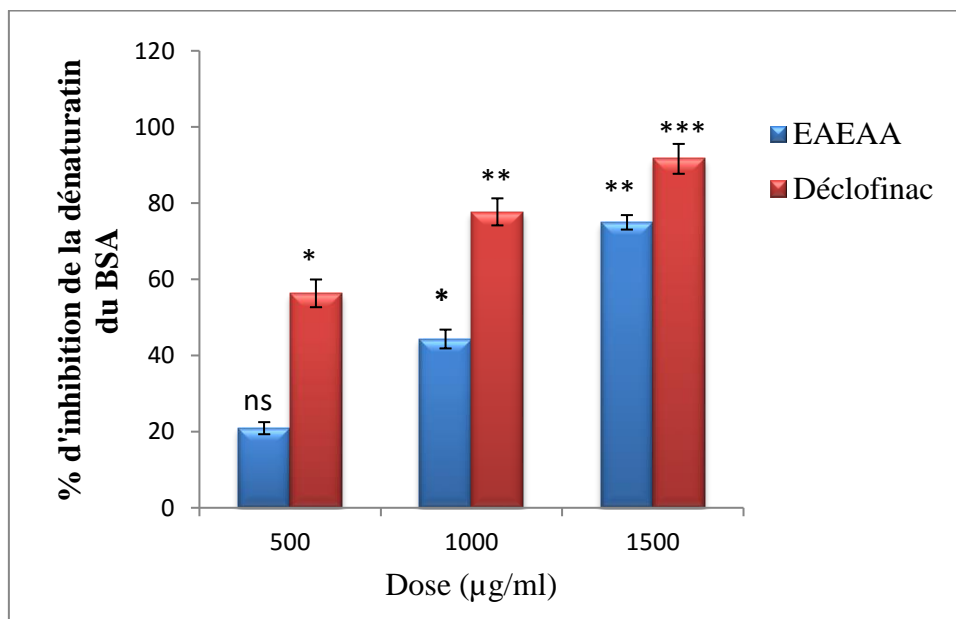


Figure 15: Effet d'*éphédra alata alenda*: Pourcentage d'inhibition de la dénaturation du BSA. EAEAA : Extrait Aqueux d'*Ephédra Alata Alenda*. Les valeurs représentent les

moyennes \pm Sd. (n=3). ns : non significatif, $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif.

La figure 15 représente les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait aqueux d'*éphédra alata alenda* qui consiste à évaluer les pourcentages d'inhibition de la dénaturation de Bovine sérum albumine (BSA).

Une inhibition très significative ($p < 0,01$) enregistré à la dose 1500 $\mu\text{g/ml}$ qui est estimée à 74,96 %, puis significative ($p < 0,05$) a la dose 1000 $\mu\text{g/ml}$ avec un pourcentage de 77,71% ; suivis d'une inhibition non significative ($p > 0,05$) à la dose 500 $\mu\text{g/ml}$ qui est estimée à 20,90 %. Cependant le diclofénac sodium inhibe hautement significativement ($p < 0,001$) la dénaturation du BSA à un pourcentage de 91,93 % à la concentration 1500 $\mu\text{g/ml}$ puis une inhibition très significative de la concentration 1000 $\mu\text{g/ml}$ estimée à 77,71% et enfin inhibition significative à un pourcentage de 56,31% pour la concentration 500 $\mu\text{g/ml}$.

L'activation incontrôlée ou prolongée de l'inflammation peut provoquer des altérations dangereuses, telles que la dénaturation de protéines. Ces dernières subissent une perte de leur structure qui aboutit à l'exposition d'auto antigènes (Clos, 2012), auparavant cryptiques, donnant naissance à de nombreuses maladies (arthritiques, rhumatoïdes,...) (Lanneau, 2010).

La dénaturation des protéines tissulaires est bien connue comme étant l'une des conséquences des maladies inflammatoires et arthritiques, aboutissant à la production d'auto-antigènes (Williams *et al.*, 2008). Le mécanisme possible de la dénaturation consiste à l'altération des liaisons électrostatiques, hydrogène, hydrophobe et disulfure qui maintien la structure tridimensionnelle des protéines (Manvarmital *et Desai*, 2014). Ce type d'inhibition de la dénaturation de la BSA est une caractéristique typique des composés anti-inflammatoires.

L'activité anti-dénaturante de l'extrait pourrait être due à l'interaction de certains composants avec deux sites (présents au niveau de certaines protéines ex : albumine) de liaisons riches en Tyrosine, Thréonine et Lysine (Williams *et al.*, 2002). Lu et ses collaborateurs ont rapportés que les composants des plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle, exercent leurs effets pharmaceutiques grâce à leur capacité de se lier aux protéines plasmatiques (Lu *et al.*, 2008). En effet selon l'étude effectuée par Dufour et Dangles (2004) sur l'interaction des flavonoïdes avec l'albumine, cette dernière possède

une forte affinité pour la quercétine, ce qui pourrait expliquer l'activité protectrice des polyphénols contre la dénaturation thermique de l'albumine.

Il est prouvé que les anti-inflammatoires non stéroïdiens comme le phénylbutazone et l'indométhazine n'inhibent pas seulement la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, mais inhibent aussi la dénaturation des protéines (Sangeetha *et al.*, 2011). Ils empêchent la dénaturation d'albumine traitée par la chaleur à pH physiologique (pH: 6.2 à 6.5). D'après les résultats, on constate que l'extrait aqueux d'EAA est capable de contrôler la production d'auto-antigène par l'inhibition de la dénaturation des protéines. L'activité inhibitrice de la dénaturation de BSA est peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs tels que les polyphénols, flavonoïdes et les tannins dans l'extrait trouvés lors des criblages phytochimiques. De nombreuses études ont évalué l'effet inhibiteur de différents extraits de plantes sur l'activité anti-inflammatoire *in vitro* par la méthode de la dénaturation des protéines.

On peut conclure que l'EAA possède un effet anti-inflammatoire marqué *in vitro* contre la dénaturation des protéines, et que d'autres études définitives sont nécessaires pour déterminer les mécanismes et les électeurs derrière ses actions anti-inflammatoires.

3.2. Stabilisation des membranes des globules rouge humains

Le test se base sur l'effet de l'extrait de la plante étudiée sur la protection de la membrane des globules rouges humains après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique. Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait qui compte sur l'évaluation de pourcentage d'inhibition d'hémolyse des globules rouge humains (GRH). Le pourcentage d'inhibition d'hémolyse pour l'extrait d'*éphédra alata alenda* avec les concentrations testées (500, 1000, 1500 µg/ml) et le diclofénac avec les mêmes concentrations sont représentées dans la figure 16.

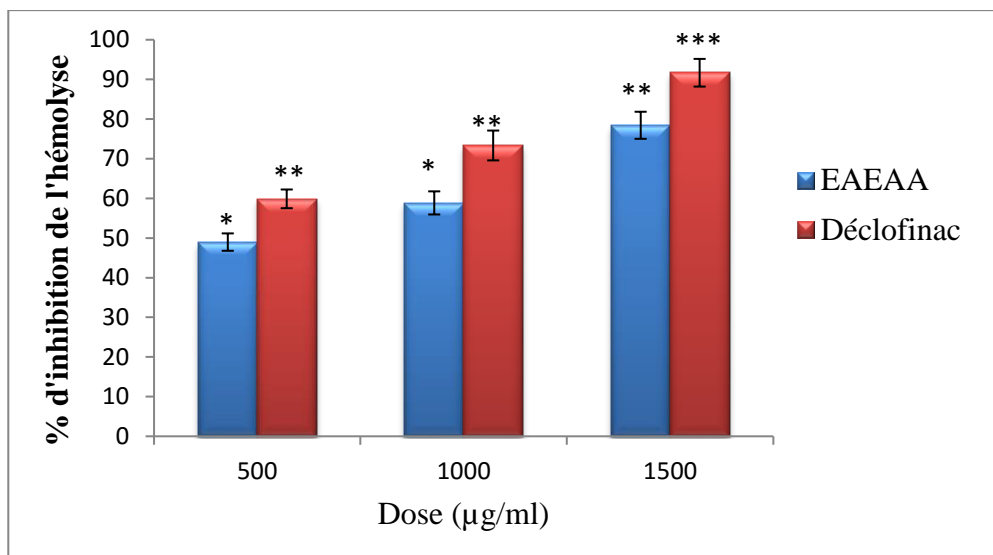


Figure 16 : Effet de l'extrait de l'éphédra *alata alenda* sur l'hémolyse des GRH.

EAEAA : Extrait Aqueux d'*Ephédra Alata Alenda* Les valeurs représentent les moyennes \pm Sd.

ns : non significatif, $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif.

Les résultats présente une forte activité anti-hémolytique, cette activité est dose dépendante. L'effet protecteur de l'extrait contre l'hémolyse des globules rouges provoqué par hypotonie est significatif à la concentration de 500 $\mu\text{g/ml}$ (48,97 %) et 1000 $\mu\text{g/ml}$ (58,86%), et elle atteint un pourcentage très significatif de 78,43 % à une concentration de 1500 $\mu\text{g/ml}$.

La stabilisation de la membrane des érythrocytes, testée par l'extrait, a été comparée à celle du diclofenac

Concernent le diclofénac nous avons marqué une inhibition hautement significative ($P < 0.001$) du taux d'hémolyse des GRH a la dose 1500 $\mu\text{g/ml}$. Le taux d'inhibition est estimé à 91,68 % à une concentration de 1500 $\mu\text{g/ml}$, de 73,34 % à 1000 $\mu\text{g/ml}$ et de 59,88 % à 500 $\mu\text{g/ml}$.

La stabilisation de la membrane des érythrocytes, testée par l'extrait, a été comparée à celle du diclofenac, D'après l'analyse on remarque que l'extrait aqueux présente une activité un peu proche par rapport à l'anti-inflammatoire standard (diclofénac).

De nombreux rapports précédents prouvent que des enzymes lysosomiales s'échappent de l'intérieur de leurs limites et pénètrent dans l'environnement extracellulaire pendant

l'inflammation aiguë et chronique. Il est apparu qu'une approche simple à l'interruption du processus inflammatoire pourrait être l'utilisation des agents stabilisant la membrane du lysosome, en empêchant la libération des enzymes hydrolytiques par les lysosomes, qui causent la dégradation tissulaire et l'augmentation du stress oxydatif au sein des organes, des tissus. Ces enzymes endommagent les macromolécules des membranes cellulaires et induisent la peroxydation lipidique, aboutissant à la destruction de ces membranes, menant ainsi à l'activation de protéines responsables de l'inflammation, provoquant alors la production des espèces oxydatives (**Ignarro, 1974 ; Vadivu et Lakshmi, 2008 ; Oyedapo et al., 2015**).

Les membranes plasmiques demeurent des structures fluides et le maintien de la fluidité est un pré requis, pour la fonction, la viabilité, la croissance et la reproduction des cellules (**Portier et al., 2007**). De ce fait, des modèles divers ont été proposés et employés pour examiner l'efficacité anti-inflammatoire des extraits de plantes, notamment le test de stabilisation de la membrane de globule rouge, via l'exposition des érythrocytes à une solution hypotonique, en raison de la ressemblance de la membrane de lysosome avec celle du globule rouge (**Reshma et al., 2014 ; Oyedapo et al., 2015**).

L'exposition des érythrocytes aux substances nuisibles, comme le moyen hypotonique aboutit à la lyse de sa membrane accompagnée par l'hémolyse et l'oxydation d'hémoglobine.

Dans un milieu isotonique, les hématies tentent de maintenir un équilibre entre la concentration ionique du milieu extracellulaire et celle du milieu intracellulaire. Dans une solution hypotonique, l'afflux d'eau est plus grande que la fuite ainsi, l'eau pénètre dans l'hématie (selon son gradient de concentration), qui se gonfle et devient sphérique. La membrane cellulaire est relativement inélastique et rompt après seulement une augmentation de volume très légère, l'hématie subit ainsi l'hémolyse, qui provoque l'ouverture des pores membranaires, dénommés pores d'hémolyse, laissant la membrane cellulaire (le fantôme) vide (**Seeman, 1967 ; Kalavani et al., 2016**). Le maintien de la forme de disque biconcave des globules rouges est important pour leur fonction. D'après **Ham et Shen, (1948)**.

Le diclofenac, anti-inflammatoire non stéroïdien, a été aussi testé et a démontré son potentiel anti-hémolytique à 200 µg/mL. Ce médicament possède des propriétés analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire. Cette dernière est liée à son inhibition de la synthèse de prostaglandines et de thromboxane, en inhibant l'action des deux isoformes

de l'enzyme membranaire cyclo-oxygénase (COX-1 et COX-2), provoquant ainsi l'altération de la fonction des plaquettes, en inhibant leur agrégation (**Ahmad et al., 2013**).

Il est connu que la membrane de GR est structurellement équivalente à la membrane lysosomiale. Pour toute substance protégeant la membrane GR peut être prévue comme un stabilisateur de la membrane lysosomiale (**Mohammed Munawar et al., 2015**). La Lyse membranaire des GRs est causée par les blessures ou de l'hémolyse ou bien de l'oxydation d'hémoglobine. Ce type de dommage est causé par des dommages secondaires des GRs par l'intermédiaire de la peroxydation lipidique induite par des radicaux libres ainsi que la libération des médiateurs inflammatoires comme les phospholipases (**Gaffo et al., 2006**).

La méthode de la stabilisation des membranes des GRH a été choisie pour l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de *l'éphédra alata alenda in vitro* car la membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomiale et sa stabilisation implique que l'extrait peut ainsi stabiliser les membranes lysosomiales. La Stabilisation de la membrane lysosomiale est importante dans la limitation de la réponse inflammatoire en empêchant la libération de constituants lysosmiques des neutrophiles activés tels que les enzymes bactéricides et les protéases qui provoquent une inflammation des tissus et d'autres dommages lors de la libération extracellulaire (**Shendkar et al., 2014**). L'hémolyse induite par l'hypotonicité peut découler de la perte des cellules en raison de la perte de pression osmotique de liquide intracellulaire et composant électrolytique. L'extrait peut inhiber les processus, qui peuvent stimuler ou d'améliorer l'afflux de ces composants intracellulaires (**Kumar et al., 2012**).

En effet, la protection de la membrane des globules rouges, par l'extrait aqueux *D'éphédra alata alenda*, pourrait être liée à leur composition chimique qui est riche en polyphénols, les flavonoïdes, Tanins, les saponosides, Huiles essentielles, possédant des propriétés anti-inflammatoire.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait *d'éphédra alata alenda* montre que cette plante possède un pouvoir pharmacologique, ce qui valide son usage traditionnel pour le soulagement de diverses affections inflammatoires. Ces études doivent être orientées vers la détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires des composés actifs de l'extrait d'EAA, et l'évaluation de leurs effets sur le processus inflammatoire,

4. Activité Anti-inflammatoire *in vivo*

4.1. Criblage de l'activité anti-œdémateuse

L'étude a été conçue pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de la plante *éphédra alata alenda*. Les expériences ont été réalisées sur le modèle de l'œdème de la patte de souris induit par le formol. Il est testé sur ce modèle l'extrait aqueux à la dose de 150mg/kg et 300 mg/kg qui administré par voie intra-péritonéale. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux d'un médicament anti-inflammatoire non stéroïdien qui est le diclofénac et à ceux du contrôle. Après l'injection du formol une augmentation significative du volume de la patte des souris des groupes testées après 30, 60, 120 et 180 mn (**Figure 17**).

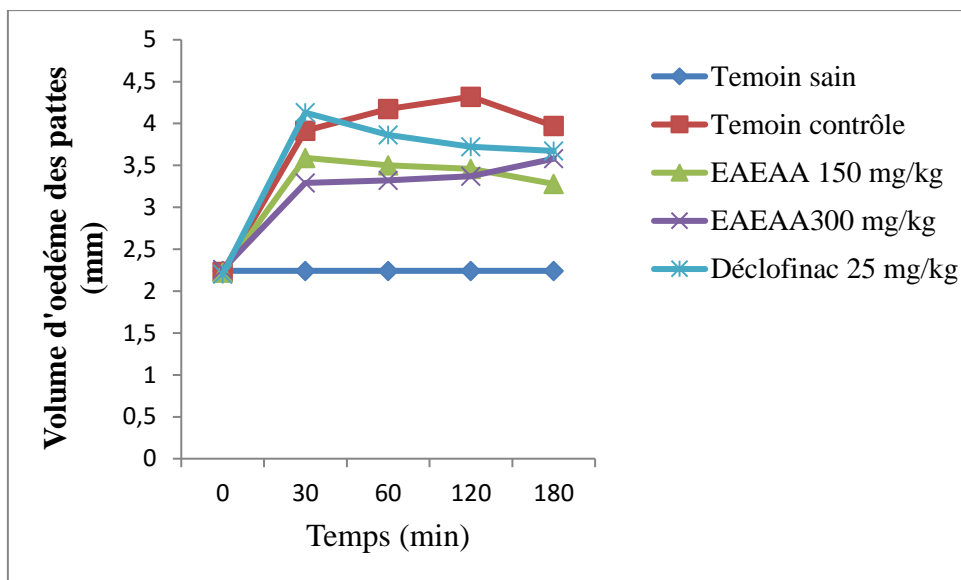


Figure 17: Effet de l'extrait aqueux EAA sur l'œdème des pattes induites par le formol chez la souris. Les valeurs représentent les moyennes \pm Sd (n = 5).

4.2. Pourcentage d'augmentation du volume de la patte (% AUG)

➤ Groupe contrôle

L'administration du formol entraîne une augmentation très significative ($p < 0,01$) du pourcentage de l'augmentation du volume des pattes des souris de groupe contrôle (71.12%) en comparaison avec le groupe témoin sain dans les 30 premières minutes.

A partir de la première heure jusqu'à la troisième heure de l'expérimentation une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) du volume de la patte des souris est observée estimée à 87,83 ; 94,59 et 78,82 % respectivement (**Figure 18**).

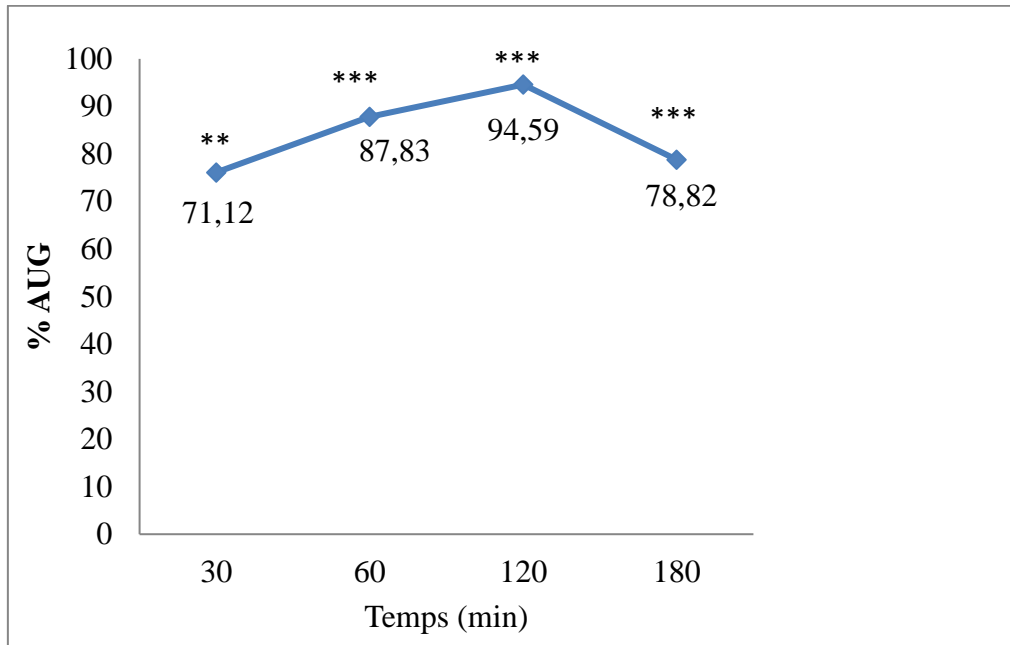


Figure 18: Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte de groupe contrôle. Les valeurs représentent les moyennes \pm sd. ns : non significatif, $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=5).

➤ Groupe standard

Pour le groupe standard, les résultats obtenus montrent que l'administration de l'anti-inflammatoire de référence diclofénac à (25 mg/kg) provoque une diminution significative ($p < 0,05$) du volume de la patte des souris à partir de la deuxième heure qui est estimée à 69,09 et de 66,81 % à la troisième heure en comparaison avec le groupe contrôle

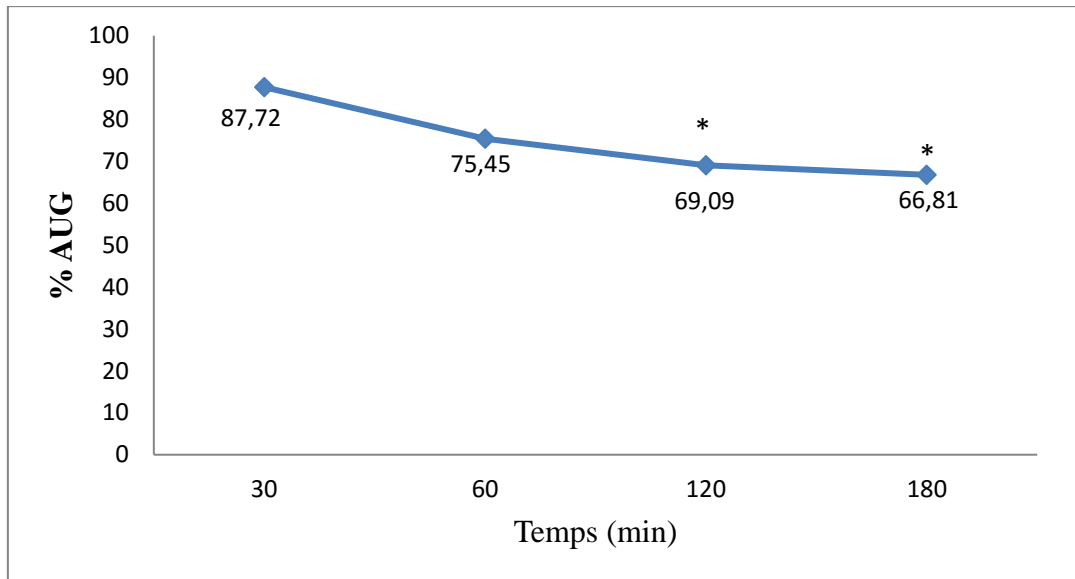


Figure 19: Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte de groupe standard. Les valeurs représentent les moyennes \pm sd. ns : non significatif, $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=5).

➤ **Groupes traités (150 et 300 mg/kg)**

L'administration de EAEAA de la dose 150 mg/kg provoque une diminution non significative ($p > 0,05$) dans le volume d'œdème au niveau des pattes des souris pendant une demi-heure, cependant une diminution significative ($p < 0,05$) a été enregistrée dans la première heure qui est estimée à 57.65 %. Alors qu'à la deuxième et la troisième heure une diminution très significative ($p < 0,01$) a été enregistrée, elle est de l'ordre de 55.58 et 47.74 % respectivement à la comparaison avec le groupe contrôle (**Figure 20**)

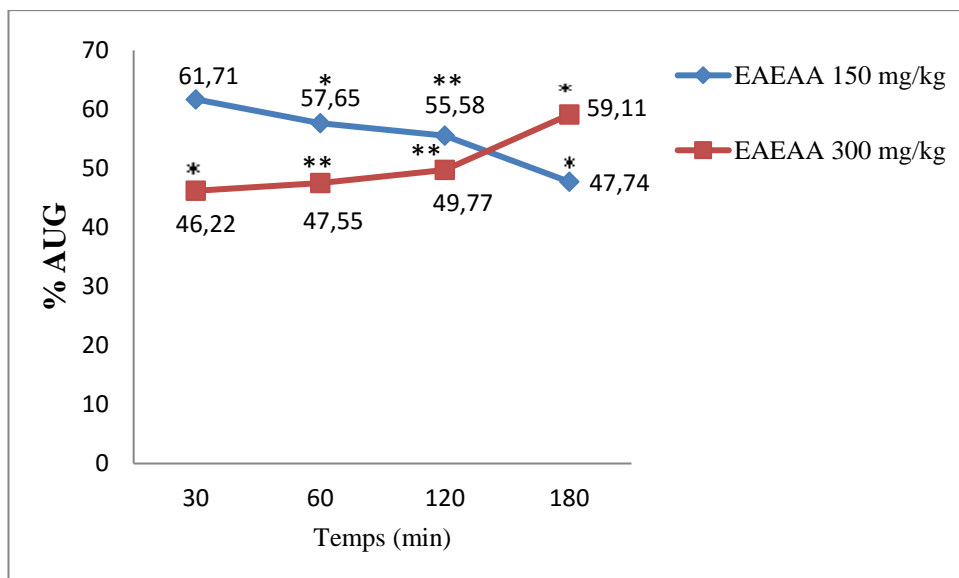


Figure 20: Pourcentage de l'augmentation du volume de la patte de groupe traité par EAEAA. Les valeurs représentent les moyennes \pm sd. ns : non significatif, $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=5).

La dose 300 mg/ kg inhibe très significativement l'injection du formol qui est estimé à 46.22, 47.55 et de 49.77 % après 30, 60 et 120 minutes respectivement (**Figure 20**).

4.3. Pourcentage d'inhibition de l'œdème de la patte (%INH)

➤ Groupes standards

Pour le groupe standard, l'administration du diclofénac à une dose de 25 mg/kg de p.c. présente une inhibition non significative ($p > 0,05$) de l'œdème de la patte de souris toute la période de l'expérimentation. Il est de l'ordre de 14.06 ; 26.95 et 15.23 % à la première, deuxième et la troisième heure respectivement (**Figure 21**).

➤ Groupe traité EAEAA (150 mg /kg)

L'administration intra-péritonéale de l'extrait aqueux de *Ephédra alata alenda* à la dose de 150 mg/kg présente une activité inhibitrice significative ($p < 0,05$) de l'œdème de la patte des souris, qui est estimé à 34.36 ; 41.24 et de 39.43 % à la première, deuxième et la troisième heure respectivement (**Figure 21**).

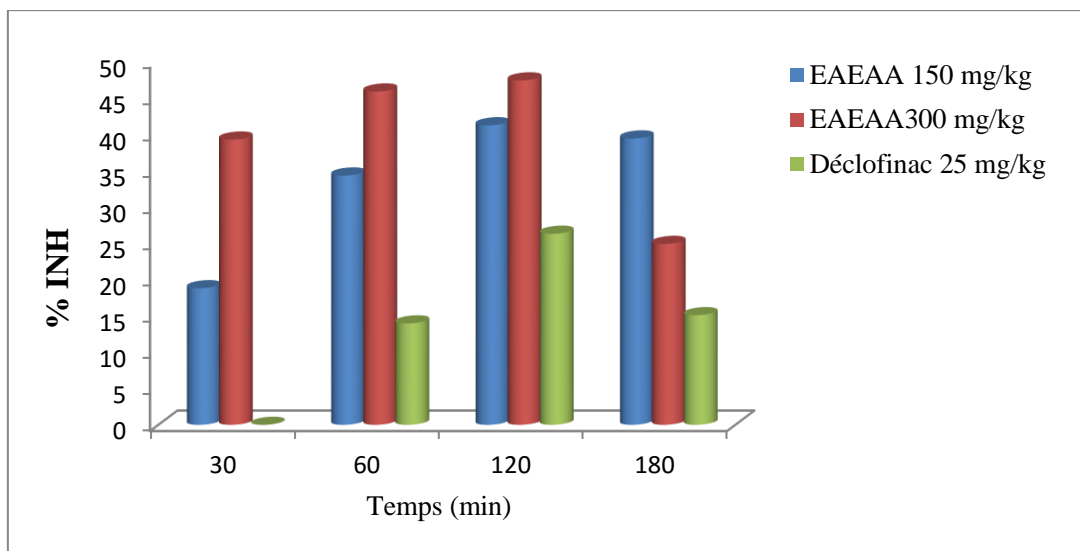


Figure 21: Pourcentage moyen d'inhibition de l'œdème des pattes droites des souris. Les valeurs représentent les moyennes \pm Sd. (n=5).

➤ **Groupe traité EAEAA (300 mg /kg)**

A la dose de 300 mg/kg l'effet inhibiteur significatif de l'extrait de *Ephédra alata alenda* administré par intra-péritonéale se manifeste dès la deuxième et la troisième heure qui suit l'injection de la formole avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de 45.86 et de 47.38 % (**Figure 21**).

4.4. Effet de l'extrait aqueux d'*Ephédra alata alenda* sur le taux des cellules immunitaire

Les résultats de la FNS ont révélé une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) des leucocytes chez le groupe contrôle. Il est de l'ordre de $10.08 \pm 0.46 \times 10^9$ cell/L par apport au témoin sain qui est estimé par $3.33 \pm 0.11 \times 10^9$ cell/L (**Figure 22**). Cette augmentation est due à une forte inflammation dans le corps.

Une diminution significative ($p < 0,05$) de nombre des leucocytes a été enregistrée chez le lot traité par l'infusé de l'*éphédra alata alenda* à la dose de 150 et mg/kg, qui est estimée à $4.76 \pm 1.22 \times 10^9$ cell/L par apport au témoin contrôle. Cependant le lot traité par le diclofenac (25mg/kg) a montré une diminution significative ($p < 0,05$) estimé par $6.1 \pm 0.4 \times 10^9$ cell/L. tandis qu'au lot traité par la dose 300 mg/kg a donné un résultat similaire au

témoin contrôle $10,08 \pm 0,46 \times 10^9 \text{cell/L}$ et n'a présenté aucune diminution significative dans le taux des leucocytes (**Figure 22**).

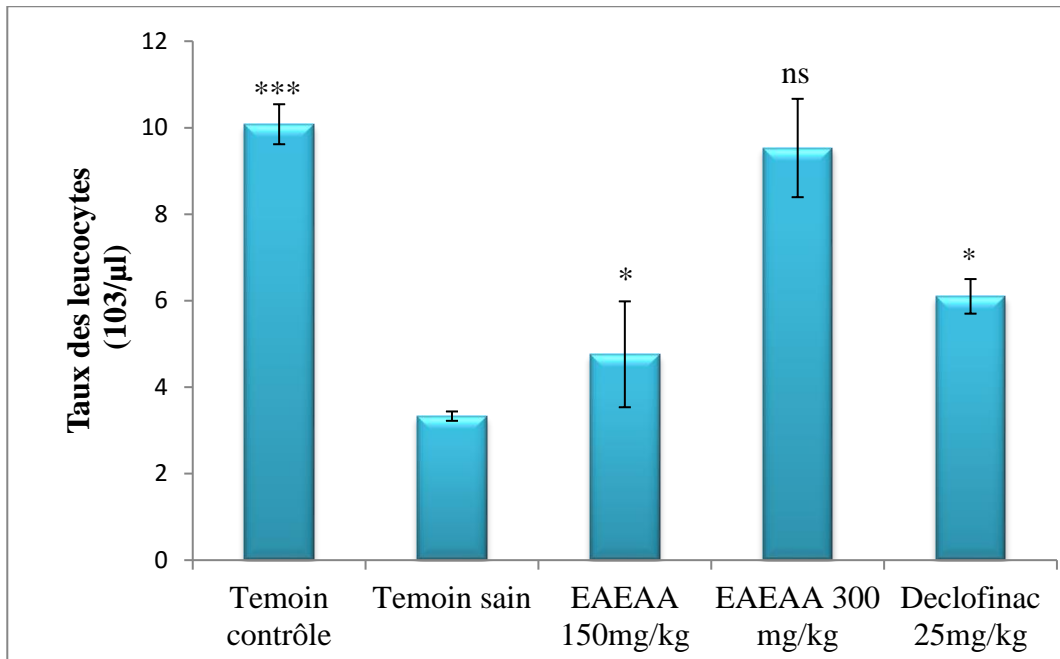


Figure 22: Taux des leucocytes chez les différents groupes traités. Les valeurs représentent les moyennes \pm Sd. EAEAA ; Extrait aqueux de *Ephedra alata alenda*. ns : non significatif, $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=5).

D'après la figure 23, le taux des monocytes du témoin contrôle qui est estimé à $1,68 \pm 0,21 \times 10^9 \text{cell/L}$ a révélé une augmentation très significative ($p < 0,01$) à la comparaison avec le témoin sain qui est estimé à $0,66 \pm 0,05 \times 10^9 \text{cell/L}$. Alors que le lot traité par l'infusé de l'*éphédra alata alenda* à la dose de 150 mg/kg a enregistré une diminution significative ($p < 0,05$) dans le taux des monocytes qui est estimé à $0,52 \pm 0,21 \times 10^9 \text{cell/L}$. Cependant les deux lots traités par le diclofénac (25 mg/kg) et la dose 300 mg/kg inhibent non significativement l'augmentation estimée à une valeur de $1,40 \pm 0,13 \times 10^9 \text{cell/L}$ et de $1,1 \pm 0,17 \times 10^9 \text{cell/L}$ respectivement en comparaison avec le lot contrôle.

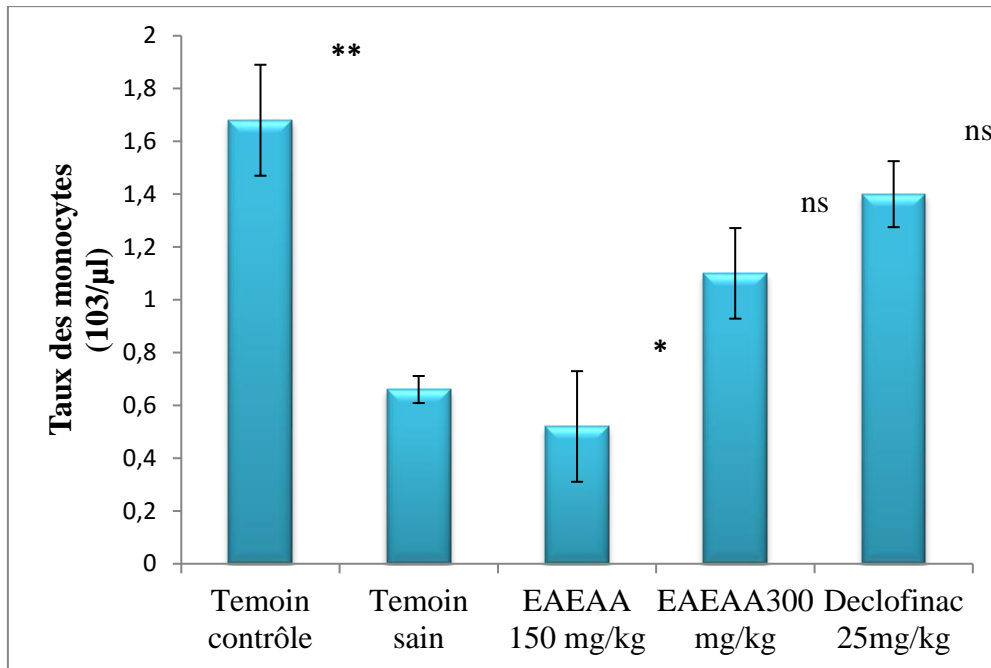


Figure 23 : Taux des monocytes chez les différents groupes traités. Les valeurs représentent les moyennes \pm Sd. EAEAA : Extrait aqueux de *ephedra alata alenda*. ns : non significatif, $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=5).

Concernant les lymphocytes, une augmentation très significative ($p < 0,01$) des lymphocytes du lot contrôle estimé à $3,44 \pm 0,97 \times 10^9$ cell/L en comparaison avec le témoin sain ($2,07 \pm 0,04 \times 10^9$ cell/L). Une diminution Non significative ($p > 0,05$) a été remarquée pour le groupe traité par la dose de 150 mg/kg et par le diclofinac (25 mg/kg) par rapport au contrôle, qui est estimé à $3,53 \pm 0,64$ et de $3 \pm 0,30 \times 10^9$ cell/L respectivement. Cependant le groupe traité par l'infusé à la dose de 300 mg/kg a montré une hyper lymphocytose affirmée par un nombre de lymphocytes sanguins supérieur au lot sain et le lot contrôle estimé à $6,8 \pm 0,33 \times 10^9$ cell/L (**Figure 24**).

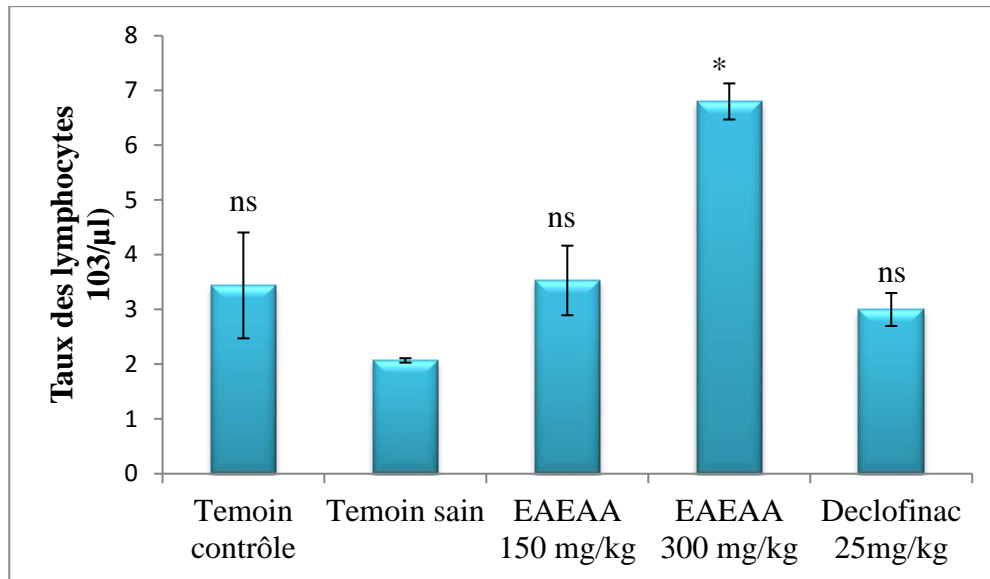


Figure 24: Taux des lymphocytes chez les différents groupes traités. Les valeurs représentent les moyennes \pm Sd. EAEAA : Extrait aqueux de *ephedra alata alenda* .ns : non significatif, $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=5).

Une augmentation très significative ($p < 0,01$) des granulocytes du groupe contrôle estimé par $2.73 \pm 0.52 \times 10^9$ cell/L par rapport le témoin sain qui estimé $0.67 \pm 0.04 \times 10^9$ cell/L. Cependant une diminution significative ($p < 0,05$) a été enregistré pour le l'infusé à la dose de 150 mg/kg par rapport le contrôle ou le taux est des granulocytes est similaire au lot témoin sain estimé par $0.69 \pm 0.28 \times 10^9$ cell/L. Une diminution non significative a été observé chez le groupe traité par la dose 300 mg/kg et par dècofinac (25mg/kg) par un pourcentage de 1.61 ± 0.27 et $1.70 \pm 0.31 \times 10^9$ cell/L respectivement (**Figure 25**).

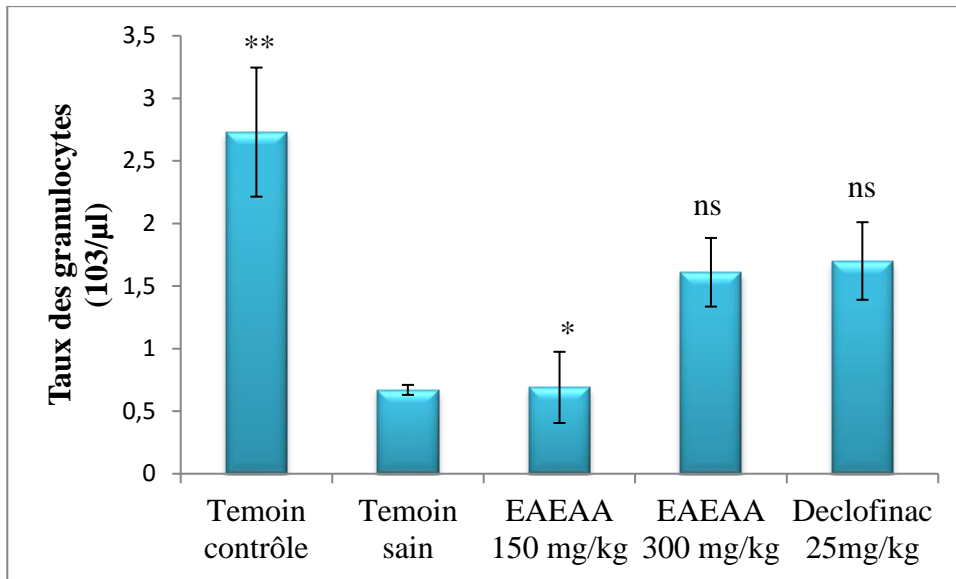


Figure 25 : Taux des granulocytes chez les différents groupes traités. Les valeurs représentent les moyennes \pm Sd. EAEAA : Extrait aqueux de l'*Ephédra alata alenda*. ns : non significatif, $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=5).

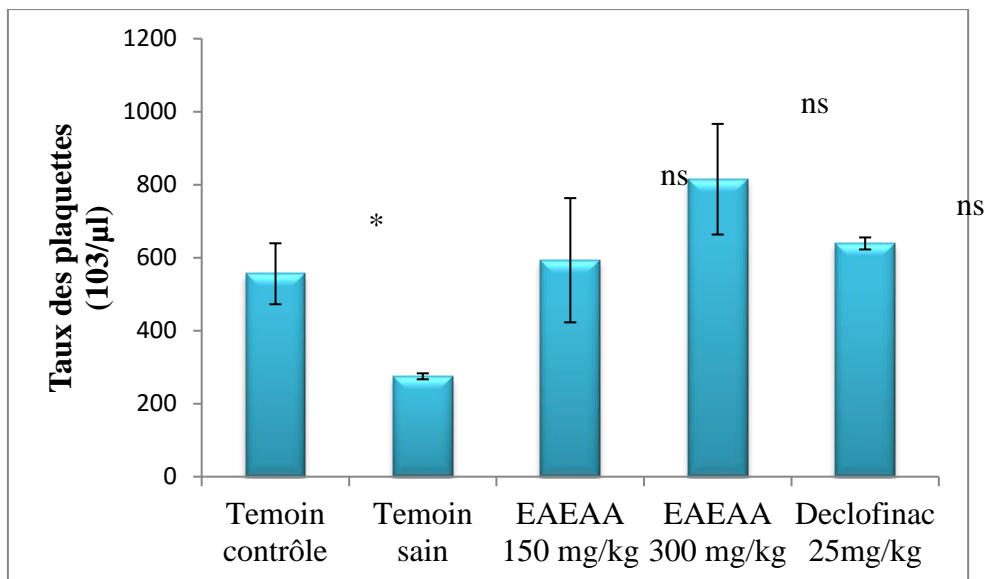


Figure 26: Taux des plaquettes chez les différents groupes traités. Les valeurs représentent les moyennes \pm Sd. EACs : Extrait aqueux de *ephedra alata alenda*. ns : non significatif, $p < 0,05$ *significatif, $p < 0,01$ ** très significatif, $p < 0,001$ *** hautement significatif, (n=5).

Pour les plaquettes, une augmentation significative ($p < 0,05$) a été enregistrée chez le groupe contrôle estimé à $556 \pm 83.52 \times 10^9 \text{cell/L}$ par rapport au témoin sain ($275 \pm 8.19 \times 10^9 \text{cell/L}$). Cependant une augmentation non significative a été enregistrée par les groupes traités par l'extrait à la dose de 150 et 300 mg/kg et le diclofenac (25mg/kg) à la comparaison avec le contrôle. Il est de l'ordre de $593 \pm 170.23 \times 10^9 \text{cell/L}$; 815 ± 151.57 et $639.33 \pm 16.50 \times 10^9 \text{cell/L}$ respectivement (**Figure 26**).

Les résultats obtenus à l'issue des tests anti-inflammatoires montrent que l'extrait aqueux de EAEAA, réduit de façon appréciable l'œdème induit par le formol. Dans les conditions expérimentales le formol a provoqué l'œdème dont le volume est maximal au bout de deux heures.

L'inhibition de l'œdème de l'extrait aqueux de la plante à la dose 150 est comparable, à celle du diclofénac. La richesse de l'extrait aqueux de la plante en différents constituants chimiques peut justifier cette activité.

Les plantes médicinales ou plus exactement les métabolites secondaires bioactives dérivées des plantes médicinales comme ils possèdent un effet pharmacologique peuvent aussi avoir un effet toxique.

On constate d'après les résultats obtenus, que le lot traité par la dose 150 mg/kg n'a montré aucun signe de toxicité. En revanche, des tremblements ont été notés chez les souris des lots traités par la concentration 300 mg/kg de L'extrait, les souris ont montrés des signes de faiblesse associés à l'isolement individuel, Hyperthermie, somnolence, leurs mouvements diminuent et la respiration devient difficile (Dyspnée).

D'après les travaux antérieurs d'**Otmani et al** (2016) Ces effets pourraient être dus à la présence des alcaloïdes qui sont toxiques à forte dose tels que la protopine et la cryptopine selon **Zeggwagh et al** (2013) Des études sur les effets indésirables de la phytothérapie montrent que la plupart des effets nocifs des plantes médicinales sont rapportés au non-respect de la dose adéquate.

L'inflammation aiguë induite chez la souris par l'injection du formol est un modèle standard et pratique, largement utilisé pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de différents agents (**Jilroy et al., 1999**).

Le mécanisme cellulaire et moléculaire par lequel le formol induit le processus inflammatoire est connu. Elle stimule la libération de l'histamine et de la sérotonine par les mastocytes, débutant par cela une cascade d'évènements qui produisent d'autres médiateurs qui contribuent à l'établissement de la réaction inflammatoire aiguë (**Cuzzocrea et al., 1998**). En effet, le formol induit au cours de la phase précoce (1-2h) de la réaction inflammatoire, la production de facteurs pro-inflammatoires tels que l'histamine, la sérotonine, les leucotriènes, le PAF et les prostanoïdes.

Ces facteurs provoquent des modifications vasculaires qui conduisent à l'exsudation plasmatique. Durant la phase tardive de ce processus inflammatoire (4-12h), ces facteurs chimioattractants induisent le recrutement des neutrophiles par chimiotactisme envers le site inflammatoire, où ils libèrent leur arsenal cytotoxique et d'autres médiateurs inflammatoires (**Dawson et al. , 1991 ; Cuzzocrea et al. ,2000a, b**).

Deux populations de cellules inflammatoires interviennent au cours de l'inflammation induite par le formol, Les neutrophiles prédominent durant les 12 premières heures, Ils sont ensuite remplacés par les monocytes qui se différencient en macrophages tissulaires, Ces mononucléaires dominent alors la réaction inflammatoire jusqu'à sa résolution après 48heures (**Jilroy et al., 1999**).

L'infiltration des PMNs vers le site de l'inflammation des souris durant les 4 premières heures qui suivent l'injection du formol a été exploitée dans la présente étude pour évaluer l'effet anti-inflammatoire *in vivo* de l'extrait aqueux des feuilles l'*Ephédra alata alenda*. Nous avons observé que l'administration intra- péritonéale de l'extrait aux souris, atténue significativement le nombre de PMNs ayant migré vers le site de l'inflammation de ces souris ont été significativement réduits.

En plus de leurs inhibitions de la production des médiateurs pro-inflammatoires, les métabolites secondaires l'*Ephédra alata alenda* inhibent le recrutement des neutrophiles vers le site de l'inflammation par l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésions sur la paroi des cellules endothéliales des veines (**Anné et al., 1994**).

Les anthocyanines bloquent la migration des leucocytes au site inflammatoire par l'inhibition des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, et ceci par la régulation du TNF- α . **Tsuda** et ses collaborateurs (2002) rapportent que l'administration du cyanidine 3-O- β -glucoside inhibe l'inflammation induite par le zymosan. Aussi, le traitement par la cyanidine

3-O- β -glucoside réduit l'augmentation des concentrations de NO, TNF- α , IL-1 β , et CINC-1 (Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-1). De plus, la cyanidine 3-O- β -glucoside normalise les niveaux de plusieurs protéines de la phase aiguë, incluant α 2-macroglobuline, albumine, et transferrine (**Calixto et al., 2004**).

Les flavonoïdes inhibent la migration des leucocytes en bloquant leur adhésion à la paroi vasculaire (**Manthey, 2000 ; Middleton et al., 2000**). Cet effet serait dû à l'inhibition de la synthèse de l'IL-1 et le TNF- α , principaux inducteurs de l'expression des molécules adhésives sur la paroi vasculaire (**Cho et al., 2000**). Il a été rapporté en effet, que la quercétine bloque l'adhésion des leucocytes à la paroi endothéliale des veines ombilicale par l'inhibition de l'expression des ICAM-1 (**Anné et al., 1994**).

L'acide gallique à son tour inhibe la migration des leucocytes en inhibant les molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1, et E-selectin dans les cellules endothéliales vasculaires, cette inhibition est dû à l'inhibition l'IL-1, TNF- α , et le NF- κ B (**Takatoshi et al., 1999**).

Prenant ces données ensemble, les extraits aqueux de l'*Ephédra alata alenda* exerceraient leurs effets anti-inflammatoires par la réduction de la production des médiateurs inflammatoires impliqués dans le déroulement des étapes de la réaction inflammatoire aiguë induite par le formol, ainsi que par l'inhibition du recrutement des leucocytes vers le site d'inflammation en exerçant des effets anti-chimioattractants sur ces derniers.

Conclusion et perspectives

Les anti-inflammatoires sont efficaces pour le traitement des symptômes de nombreuses maladies inflammatoires, mais leurs utilisations sont limitées en raison de leurs effets indésirables, qui peuvent gêner leur utilisation à long terme. Dans ce contexte Le recours à l'utilisation des plantes médicinales riches en molécules bioactives en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Parmi ces plantes, *Ephédra alata alenda*, qui possède un pouvoir pharmacologique, dont les indications thérapeutiques sont nombreuses, notamment les activités : anti inflammatoires, antibactériennes, analgésiques, antioxydantes, grâce à sa richesse en composés actifs.

C'est dans ce but que s'inscrit notre travail qui consiste à évaluer l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait aqueux de la partie aérienne de l'*Ephédra alata alenda* sur la stabilité de la membrane du globule rouge, qui a des similitudes avec d'autres membranes cellulaires, notamment la membrane du lysosome. L'exposition des érythrocytes à des conditions nuisibles telles que, le milieu hypotonique et la chaleur, entraîne la lyse de leurs membranes accompagnées par l'hémolyse. Les résultats de ce présent travail démontrent que l'extrait aqueux d'*Ephédra alata alenda* a des effets anti-hémolytiques considérables, ce qui indique l'efficacité de cet extrait à stabiliser la membrane du globule rouge et donc la membrane du lysosome impliqué dans l'inflammation, en empêchant ainsi, la libération et l'action des intercesseurs, tels que la sérotonine, l'histamine, les leucotriènes et les prostaglandines. L'Extrait a révélé également une inhibition efficace de la dénaturation thermique du BSA avec un pourcentage de 74,96% à la dose 1500 µg/ml il est donc doté d'une activité anti-inflammatoire.

Conclusion

En effet, lors du test d'inhibition du développement de l'œdème de la patte induite par le formol chez la souris ce dernier a permis de conclure que l'extrait aqueux possède un effet anti-inflammatoire significativement à celui de diclofénac, Ces résultats montrent une efficacité comparable à celle du traitement par un AINS qui est le diclofénac sodique, ce qui confirme la validité de l'indication de cet extrait *d'Ephédra alata alenda* en médecine traditionnelle, pour prévenir les processus inflammatoires. La richesse de l'extrait aqueux de cette plante en composés phénoliques dont l'activité anti-inflammatoire a été prouvée par plusieurs études peut justifier cette activité. Les résultats obtenus lors de cette étude sont intéressants, mais des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de ces effets. Ces études doivent être aussi orientées vers la détermination des composées actives dans l'extrait *d'Ephédra alata alenda* et l'évaluation de leurs effets sur les signalisations impliquées dans le processus inflammatoire, ainsi que le mécanisme de la cytotoxicité et de stabilisation sur d'autres membranes biologiques à savoir, le lysosome.

Une majorité des personnes ne connaissent certainement pas quels sont les effets secondaires éventuels des plantes médicinales ni comment, ni quand elles peuvent être utilisées en toute sécurité. Pour cela il est nécessaire de se mobiliser en tant que professionnels de santé pour sensibiliser la population à certains grands principes : Vouloir utiliser une plante médicinale ou un remède naturel est un droit légitime pour tout patient mais il faut s'en informer et demander conseils à son médecin ou à son pharmacien. Les plantes médicinales ou remèdes naturels n'ont rien de magique. Il faut les utiliser rationnellement pour une bonne prise en charge de sa maladie car ils ne diffèrent pas fondamentalement des médicaments : ils ont des effets intéressants, des limites et des effets secondaires...

Références bibliographiques

- Abourashed E.A., El-Alfy A.T., Khan I.A. et Walker L.** (2003) Ephedra in perspective—a current review. *Phytother. Res.*, Vol. 17, PP. 703-712.
- Ahmad, I., Qureshi, T. A., Sadique, U., Khan, S. A., Ahmed, S., Rehman, Z. U., & Mushtaq, M.** (2013). Hematological effects of diclofenac sodium in goat. *The J of Animal and Plant Sci*, 23, 103-107
- Al-Qarawi A.A., Abd Allah E.F. et Hashem A.,** (2012) Effect of Ephedra alata on nucleic acids and nitrogen metabolism of seedborne *Aspergillus flavus*. *Pak. J. Bot.*, Vol. 44, N°1, pp. 425-428.
- AL-Qarawi A.A., Abd Allah E.F. et Abeer H.,** (2011) Ephedra alata as biologically-based strategy inhibit aflatoxigenic seedborne mold. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 5, N°16, pp. 2297-2303.
- Anné, S., Agarwal, M., Nair, M.P., Schwartz, S.A., Ballow, M., Kandaswami, C., Middleton, E.Jr.** (1994). Inhibition of endotoxin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte adhesion to endothelial cells by plants flavonoids quercetin. *J Allergy Clin. Immunol.*: 93: p 276
- Athamena S., Chalghem1 I., Kassah-Laouar A., Laroui S. et Khebri S.,** 2010- activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* l. *Lebanese Science Journal*, Vol. 11, N°. 1, pp. 69-81
- Awah, F. M., Uzoegwu, P.N., Ifeonu, P., Oyugi, J.O., Rutherford, J., Yao, X.J., Fehrmann, F., Fowke, K.R., Eze, M.O.** (2012). Free radical scavenging activity, phenolic contents and cytotoxicity of selected Nigerian medicinal plants. *Food Chemistry*: 131(4); 1279-1286.
- Ayoola G.S., Ipav S.S., M.O. Sofidiya, Adepoju-Bello A. A., Coker H.AB., Odugbemi T.O.,** (2008). Phytochemical Screening and Free Radical Scavenging Activities of the Fruits and Leaves of *Allanblackia floribunda* Oliv (Guttiferae). *International Journal of Health Research*, Vol. 1; N°2, pp. 87-93.

- Bagad, Y. M., Umakar, A. R., Tatia, A. U., Surana, S. J.** (2011). Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Bridelia airyshawii* (Euphorbiaceae). *J pharm Res*;4(5):1326-1332.
- Barros, L., Cabrita, L., Boas, M.V., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R.** (2011). Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants. *Food Chemistry*: 127(4); 1600-1608.
- Barros, L., Falcão, S., Baptista, P., Freire, C., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R.** (2008).Antioxidant activity of *Agaricus sp.* mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chem.*; **111**: 61–66.
- Benkhniq O., Zidane L., Fadli M., Elyacoubi H., Rochdi A. et Douira1 A.,** (2011). Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc.*, Vol. 53, pp.191-216
- Benkhniq, O., Zidane, L., Fadli, M., Elyacoubi, H., Rochdi, A., Douira A.,** (2011) Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraâ Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc). *Acta Bot. Barc* :53 ; 191-216
- Benzahi, K.** (2001). Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la Plante Cynodn Dactylon-L.mémoires de Magister. *Université de Ouargla*; p.15-17.
- Blaschke S., Middel P., Dorner BG., Blaschke V., Klaus M., Hummel KM., KroczeK RA., Reich K., Benoehr P., Koziolk M., Gerhard A. Müller GA.** (2003). Expression of activation-induced, T cell-derived, and chemokine-related cytokine/lymphotactin and its functional role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*:48; 1858-1872.
- Boissier, M.C., Bessis, N., Falgarone, G.** (2002). Options for blocking interleukin-1 in patients with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*: 69; 351-354.
- Bone loss, Roux, S., Orcel, P.** (2016). Factors that regulate osteoclast differentiation: an update. *Arthritis Res.*; 2:451–456.
- Boozer C.N., Nasser JA., Heymsfield S.B., Wang V., Chen G. et Solomon J.L.,** (2001). An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, doubleblind trial. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, Vol. 25; N°3, pp. 316-324.
- Boutry, N., Cotten, A.** (2010). Apport de l'échographie dans les rhumatismes inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde, pseudopolyarthrite rhizomélique et spondylarthropathies). *La Revue de médecine interne* ;31:29–40.

- Brennan, F.M., Mc Innes, I.B.** (2008). Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*: 118; 3537-3545.
- Bruhl, H. Cihak J, Niedermeier M, Denzel A, Rodriguez Gomez M, Talke Y, Goebel N, Plachý J, Stangassinger M, Mack M** (2009). Important role of interleukin-3 in the early phase of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*: 60; 1352-1361.
- Bruneton J.**, (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Lavoisier Tec & Doc (4eme Ed.), 1268 p.
- Bruneton, J.** (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4^{ème} Edition *Lavoisier*.
- Calixto, J.B., Campos, M.M., Otuki, M.F., Santos, A.R.** (2004). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med*; 70(2): 93-103.
- Cantagrel, A., Degboéa, Y., Constantina, A., Davignona, J.L.** (2017). TNF- α , interleukin-6 and interleukin-1: 3 pivotal cytokines in rheumatoid arthritis pathogenesis. *Revue du rhumatisme monographies*; 418 ; 6.
- Cascao, R., Rosario, H.S., Souto-Carneiro, M.M., Fonseca, J.E.** (2010). Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmun Rev*:9; 531-535.
- Catier O., Roux D.**, (2007). Botanique pharmacognosie phytothérapie. Wolters Kluwar (3eme Ed.), 141 p.
- Caveny S., Charlet D.A., Freitag H., Maier-Stoete M. et Starratt A. N.**, (2001). New observations on the secondary chemistry of world Ephedra (Ephedraceae). *American Journal of Botany*. Vol.88, N°7. PP. 1199–1208.
- Chaouch, N.** (2001). Étude des alcaloïdes dans la coloquinte *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad (cucurbitacées) Région de Oued N'sa (Wilaya de Ouargla). Mémoire de magister. *Université d'Ouargla- Algérie*
- Chebouat E., Dadamoussa B., Gharabli S., Gherraf N., Allaoui M., Cheriti A., Lahham A. et Zellagui A.**, (2014). Assessment of antimicrobial activity of flavonoids extract from *Ephedra alata*. *Der Pharmacia Lettre*, Vol. 6, N°3, pp. 27-30.
- Chebrouk F.**, (2009). Caractérisations analytiques de quelques composés polyphénoliques et terpéniques issus de la plante *Marrubium deserti* de la région de Ghardaïa. Mémoire de magister. "Chimie organique appliquée". Université Kasdi Merbah Ouargla. P.60.

- Chen W.L., Tsai T.H., Yang C.C.H., Kuo T.B.J.,** (2010). Effects of ephedra on autonomic nervous modulation in healthy young adults. *Journal of ethnopharmacology*, Vol. 130, pp. 563–568.
- Cho, K.j., Yun, C.H., Yoon, D.Y., Cho, Y.S., Rimbach, G., Packer, L., Chung, A.S.** (2000). Effect of bioflavonoids extracts from the bark of *Pinus maritime* on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 168: 64-71.
- Cho, Y.G., Cho, M.L., Min, S.Y. & Kim, H.Y.** (2007). Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*;7; 65-70.
- Chopra C., Abrol B. K. et Handa K. L.,** (1960). Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique: lière partie. Recherche sur les zones arides XIII. Ed. UNESCO, Rome, 97 p.
- Choy, E.H., Panayi, G.S.** (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New Engl. J. Med.* :344; 907-916.
- Cordonnier, C. Meyer O, Palazzo E, de Bandt M, Elias A, Nicaise P, Haïm T, Kahn MF, Chatellier G** (1996). Diagnostic value of anti-RA33 antibody, antikeratin antibody, antiperinuclear factor and antinuclear antibody in early rheumatoid arthritis: comparison with rheumatoid factor. *Br J Rheumatol* :35; 620-624.
- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Calabro, G., Dugo, L., De Sabro, A., Van De Loo, F., Caputi, A.P.** (2000a). Inducible nitric oxide synthase-knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *AmRespirCrit Care Med*; 162: p 1859-1866.
- Cuzzocrea, S., Santagati, S., Sautebin, L., Mazzon, E., Calabro, G., Serraino, I., Caputi, A.P., Maggi, A.** (2000b). 17 β -Estradiol anti-inflammatory activity in carrageenan-induced pleurisy. *Endocrinol*; 141(4): p 1455-1463.
- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Hake, P., Salzman, A., Szabo, C.** (1998). Anti-inflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free RadicBiol Med*; 24(3): p 450-459.
- Dawson, J., Sedgwick, A.D., Edwards, J.C.W., Lees, P.** (1991). A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *Int J Tissue React*; 13(4): 171-185.

- Derbel S., Touzard B., Triki MA. et Chaieb M.,** (2010).. Seed germination responses of the Saharan plant species *Ephedra alata* ssp. *alenda* to fungicide seed treatments in the laboratory and the field. *Flora*, Vol. 205, pp. 471–474.
- Dufour, C et Dangles, O.** (2004). Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721 : 164– 173
- Edwards, J.C.** (2016). Development and differentiation of synovial fibroblasts in auto immune arthritis. *ArthritisRes*; 2:344–347.
- Eklund, K.K. et al.** (1997).Glucocorticoids inhibit the cytokine-induced proliferation of mast cells, the high affinity IgE receptor-mediated expression of TNF-alpha, and the IL-10-induced expression of chymases. *J Immunol* :158; 4373-4380.
- Evans W.C.,** (2009). Trease and Evans' Pharmacognosy. Saunders (16eme Ed).
- Foulquier, C.** (2007).Genèse des cibles des auto- anticorps anti-protéines citrullinées dans le tissu synovial rhumatoïde : peptidyl-arginine désiminases et fibrine citrullinée. U.F.R. Sciences de la Vie et de la Terre (SVT) École Doctorale Biologie-Santé-Biotechnologies. Toulouse III : université paulsabatie-toulouse III, p 251.
- Gabay, C.** (2004). Etude retrospective sur l'évolution clinique d'une cohorte de patients avec polyarthrite rhumatoïde traitées par des inhibiteurs du TNF- α , université de Genève, faculté de médecine, Département de Médecine interne, Service de Rhumatologie, p 64.
- Gaffo, A., Saag, K. G., Curtis, J. R.** (2006) Treatment of rheumatoid arthritis. *Am J Health Sys Pharm*; **63**: 2451-2465.
- Ghanem S. et El-Magly U.I.A.,** (2008). Antimicrobial Activity and Tentative Identification of Active Compounds from the Medicinal *Ephedra alata* Male Plant. *J T U Med Sc.*, Vol. 3, N°1.pp. 7-15.
- Ghosh, S., Saha, K., Dasgupta, S.C., Gomes, A.** (2015). In vitro and In vivo Anti-Arthritic and Anti-Inflammatory Activity of BungarusFasciatus Venom.*J Toxins*; 2(1): 5.
- Ghourri M., Zidane L., Douira A.,** (2013).Usage des plantes médicinales dans le traitement du Diabète Au Sahara marocain (Tan-Tan). *Journal of Animal &Plant Sciences*, Vol.17, pp. 2388-2411.

- Gotis-Graham, I., Smith, M.D., Parker, A., McNeil, H.P.** (1998). Synovial mast cell responses during clinical improvement in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*;57; 664-671.
- Grisar, J. et al.** (2001). Phenotypic characteristics of human monocytes undergoing transendothelial migration. *Arthritis Res* : 3 ; 127-132.
- Haas, C.S. et al.** (2007). In vivo inhibition of angiogenesis by interleukin-13 gene therapy in a rat model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*;56; 2535-2548.
- Ham, T. H., & Shen, S. C.** (1948). Studies on the destruction of red blood cells; thermal injury; action of heat in causing increased spheroidicity, osmotic and mechanical fragilities and hemolysis of erythrocytes; observations on the mechanisms of destruction of such erythrocytes in dogs and in a patient with a fatal thermal burn. *Blood*, 3(4), 373.
- Hammoudi R.**, (2015). Activités biologiques de quelques métabolites secondaires extraits de quelques plantes médicinales du Sahara méridional Algérien. Thèse de doctorat. "Sciences biologiques". Université Kasdi Merbah-Ouargla. 147 p.
- Hayer, S., Redlich, K., Maier, A., Dunstan, C.R., Tohidast-Akrad, M., Lang, S., et al.** (2015) Tumor necrosis factor alpha-mediated joint destruction is inhibited by targeting osteoclasts with osteoprotegerin. *Arthritis Rheum*;46:785–792.
- Hegazi G.A.E. et El-Lamey T.M.**, (2011). In vitro Production of Some Phenolic Compounds from *Ephedra alata* Decne. *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, Vol,1, N°8, pp.158-163.
- Habibur, R., Chinna, M. E., Dutta, A.M.** (2015). *In-vitro* Anti-inflammatory and Anti arthritic Activity of *Oryza sativa* Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci* ; **15** (1): 115-121, 2015
- Hikino H., Konno C., Takata H., Tamada M.** (1980). Antiinflammatory Principle of Ephedra Herbs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 28, N °. 10, pp. 2900-2904.
- Hikino H., Takahashi M., et Konno C.**, (1982). Structure of ephedrannin a, a hypotensive principle of Ephedra roots. *Tetrahedron Letters*, Vol. 23, N°.6, pp. 673-676.
- Hong :Wang Q., Yang Y., Zhao X., Zhu B., Nan P., Zhao J., Wang L., Chen F., Liu Z. et Zhong Y.**, (2006). Chemical variation in the essential oil of *Ephedra sinica* from Northeastern china. *Food Chemistry*, Vol. 98, pp. 52-58
- Huang J. et Price R.A.**, (2003). Estimation of the Age of Extant Ephedra Using Chloroplast rbcL Sequence Data. *Mol. Biol. Evol.*, Vol. 20, N°3, pp 435–440.

- Hunter, C.A., Jones, S.A.** (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*;16 : 448–57.
- Ignarro, L. J.** (1974). Regulation of lysosomal enzyme secretion: role In *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 151, No. 2, pp. 101-106). Université de inflammation. *Agents and Actions*, 4(4), 241-258.
- Isenberg, D.A., Garrood, T., Farrow, S., Ioannou, Y., Bird, H., et al.** (2016). Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, doubleblind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis Rheum*; 46:3143–3150.
- Ji, H. et al.** (2002). Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis. *J Exp Med*:196 ; 77-85.
- Jilroy, D., Colvillr-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., Willoughby, D.A.** (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*; 5(6): p 698-701
- Kaddem, S.** (2011). La polyarthrite rhumatoïde : de nouvelles révolutions thérapeutiques.p 225-228.
- Kalavani, R., Banu, R. S., Jeyanthi, K. A., Sankari, T. U., & Kanna, A. V.** (2016). Evaluation of anti-inflammatory and antibacterial activity of *Pithecellobium dulce* (Benth) extract. *Biotechnological Research*, 2(4), 148-154.
- Kaplan, C. et al.** (2002). Th1 and Th2 cytokines regulate proteoglycan-specific autoantibody isotypes and arthritis. *Arthritis Res*:4; 54-58.
- Kawanaka, N. et al.** (2002). CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* :46; 2578-2586.
- Kebili, Z.** (2016). Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits de *Ephedra alata* de région de Ouargla. Mémoire de magister. *Université d'Ouargla- Algérie*
- Kessal A. et Bouafia O.,** (2003). Phytoscreening and antibacterial of the plants *Ephedra alata*, *Launaea residifolia* and *Oudneya africana*. Diplôme d'ingénieur d'Etat. Université Kasdi Merbah-Ouargla. Mem. p. 66.
- Koffi N., Beugré K., Guédé N., Dossahoua T., et Laurent A.,** (2009). Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature*. Vol. 6, N°2. pp 1 – 15

- Konkon N.G., Simaga D. et Adjoungova A.L.,** (2006). Etude Phytochimique de *Mitragyna inermis* (Willd.) O. Ktze (Rubiaceae), plante à feuille antidiabétique. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* 2006, Vol. 14, pp. 73-80
- Konno C., Mizuno T., Hikino H.,** (1985). Isolation and hypoglycemic activity of ephedrans A, B, C, D and E, glycans of *Ephedra distachya* Herbs. *Planta medica*, vol. 51, N°2, pp. 162-163.
- Konno C., Taguchi T., Tamada M. et Hikino H.,** (1979). Ephedroxane, anti-inflammatory principle of Ephedra herbs. *Phytochemistry*, Vol. 18, pp. 697-698. 73.
- Kumar,V., Bhat, Z. A., Kumar, D., Khan, N.A., Chashoo, I.A.** (2012). Evaluation of anti-inflammatory potential of leaf extracts of *Skimmia anquetilia*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* ; 627-630.
- Lee, M., & Feldman, M.** (1997). The aging stomach: implications for NSAID gastropathy. *Gut*, 41(4), 425-426.
- Limberger R.P., Jacques ALB, Schmitt GC. et Arbo MD.,** (2013). Pharmacological Effects of Ephedrine. *Natural Products*, pp. 1218- 1237.
- Ling M., Piddlesden S. J. et Morgan B. P.,** 1995- A component of the medicinal herb ephedra blocks activation in the classical and alternative pathways of complement. *Clinical & Experimental Immunology*, Vol. 102, N° 3, p. 582–588.
- Lu et al,** (2008) in Duganath, N., Rubesh Kumar, S., Kumanan, R et Jayaveera, K.N. (2010). Evaluation Of Anti-Denaturation Property And Anti-Oxidant Activity Of Traditionally Used Medicinal Plants. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1(2) : 1-7.
- Lubberts, E. et al.** (2000).IL-4 gene therapy for collagen arthritis suppresses synovial IL-17 and osteoprotegerin ligand and prevents bone erosion. *J ClinInvest* :105; 1697-1710.
- Ma G., Bavadekar S.A., Davis Y.M., Lalchandani S.G. Nagmani R., Schaneberg B.T., Khan I.A., et Feller D.R.,** (2007). Pharmacological Effects of Ephedrine Alkaloids on Human α 1- and α 2 Adrenergic Receptor Subtypes. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, Vol. 322, N°1, pp. 214- 221.
- Ma, Y., Pope, R.M.** (2005).The role of macrophages in rheumatoid arthritis.*CurrPharm Des*: 11; 569-580.

- Maclé, M.** (2012). la Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte, place et rôle du pharmacien d'officine dans sa prise en charge et la délivrance des biothérapies à l'officine. U.F.R. de Médecine et de pharmacie de ROUEN. P 247.
- Mansour, Sadia.** (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. *Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed BOUDIAF* ;p.3.
- Manthey, J.M.** (2000). Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirc*; 7: p 28-34.
- Manvar, Mital., Desai, N.** (2014). In-vitro Anti-inflammatory and Anti-Arthritic Activities of Fruits of *Vernonia anthelmintica* Willd. (Asteraceae). *the Journal of Pharmaceutical Research* ; 4 : p186-188.
- May J., Chan C.H., May J., King A., Williams L., French G.L.** (2000). Time kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45: 639-643.
- Merzoug B.,** (2009). Contribution à l'étude phytochimique de deux plantes de la famille des Apiaceae : *Carum montanum* Coss. & Dur. et *Bupleurum montanum* Coss. Thèse de doctorat. "Phytochimie". Université Mentouri-Constantine. P1.
- Michel, T.** (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë ramnoides*). Thèse de Doctorat. Université d'Orléans. p365.
- Middleton, E.J.R. Kandaswami, C., Heoradies, T.C.** (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev*; 52: p 673-751.
- Miyazawa M., Minamino Y. et Kameoka H.,** (1997). Volatile Components of *Ephedra sinica* Stapf. *Flavour And Fragrance Journal*, Vol. 12, 15-17.
- Mohamed Soltan M. et Kamal Zaki A.,** (2009). Antiviral screening of forty-two Egyptian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Vol. 126, pp. 102–107.
- Mohammed, Munawar. Hossain., Mohammad ,Shah .Hafez. Kabir., AbulHasanat., Montoro, P., Tuberoso ,C.I.G., Perrone, A., Piacente ,S., De ,Feo. V., Cabras, P., Pizza, C.** (2006). Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass

- spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur, *Journal of Chromatography* ;112: 232-240.
- Morel, J., Miossec, P., Combe, B.** (2004). Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *EMC-Rhumatologie Orthopédie* : 17;218–230.
- Moure A., Cruz J. M., Franco D., Dominguez J. M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M.J. et Parajo J. C.**, (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, Vol. 72, PP, 145-171.
- Nathan, C.** (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*:6; 173-182.
- Nawwar M.A.M, El-Sissi H.I., Barakat H.H.**, 1984- Flavonoid constituents of *Ephedra alata*. *Phytochemistry*, Vol. 23, N°. 12, pp. 2937-2939.
- Ossipov, M. H., Kovelowski, C. J., Porreca, F.** (1995). The increase in morphine antinociceptive potency produced by carrageenan-induced hindpaw inflammation is blocked by naltrindole, a selective delta-opioid antagonist. *Neuroscience Letter* :184 ; 173-176.
- Otmani, Amar & Yahiaoui, Sonia.** (2016). Etude de la Toxicité Aigüe et Subaigüe des Alcaloïdes de *Fumaria officinalis* sur des souris albinos Wistar. Mémoire de master. Université abdrrahmane Mira de Béjaïa.
- Ould El Hadj M.D., Hadj-Mahammed M. et Zabeirou H.**, 2003- place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (sahara septentrional est). *Courrier du savoir*. n°3, pp. 47-51.
- Oyedapo, O. O., Makinde, M. A., Ilesanmi, M. G., Abimbola, O. E., Akinwunmi, F. K., & Akinpleu, A.B** (2015). Biological activities (anti-inflammatory and antioxidant) of fraction and methanolic extract of *Philonotis hastata* (Duby Wijk & Margadant). *African journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines (AJTCAM)*, 12(4), 50-55.
- Ozenda P.**, (1991). Flore et végétation du Sahara. Centre National De La Recherche Scientifique, Paris (3ème Ed.). 662 p
- Ozenda, P.** (2004). Flora and vegetation of the Sahara. Ed. CNRS, Paris. p.662 in *Journal of Medicinal Plants Research* ;6(16): pp. 3124-3128.

- Parsaeimehr A., Sargsyan E. et Javidnia K.,** (2010). A Comparative Study of the Antibacterial, Antifungal and Antioxidant Activity and Total Content of Phenolic Compounds of Cell Cultures and Wild Plants of Three Endemic Species of Ephedra. *Molecules*, Vol.15, pp.1668-1678.
- Peters C.M., O'Neill J.O. et Young J.B.,** (2005). Is there an association between ephedra and heart failure? a case series. *Journal of Cardiac Failure*, Vol. 11, N°1, pp.9-11.
- Phinney K.W., Ihara T. et Sander L.C.,** (2005). Determination of ephedrine alkaloid stereoisomers in dietary supplements by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1077, pp. 90–97.
- Pillon. F., Michiels. Y.** (2014). Épidémiologie et physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *Nat Rev Rheumatol*: 17; 518-522.
- Portet B.,** (2007). Recherche Bioguidée de Molécules Antipaludiques d'une Plante Guyanaise: Piper hostmannianum var. berbicense ; Thèse de doctorat. Université de Toulouse. p:23-25
- Portier, K., Kirschvink, N., Fellmann, N., Coudert, J., & Lekeux, P.** (2007). Paramètres influençant la structure et la fonction du globule rouge chez le cheval. In *Annales de Médecine Vétérinaire* (Vol. 151, No. 2, pp. 101-106). Université de Liège.
- Pridgeon, C. et al.** (2003). Natural killer cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients exhibit a CD56bright, CD94 bright, CD158 negative phenotype. *Rheumatology (Oxford)*:42; 870- 878.
- Prior R.L., Wu X. et Schaich K.,** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 53, N°. 10, pp. 4290- 4302.
- Quyoun, A.** 2003 - Mise au point d'une base de données sur les plantes médicinales. Exemple d'utilisation pratique de cette base. Thèse de Doct. Univ. Ibn Tofail. Fac. Sci. Kénitra, Maroc. 110 p.
- Raza, K. et al.** (2006). Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*: 8; R120.
- Reshma, Arun, K.P., & Brindha, P.** (2014). In vitro anti-inflammatory, antioxidant and nephroprotective studies on leaves of Aegle marmelos and Ocimum sanctum. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 7, Issue 4, 2014, 121-129.

- Ribereau-Gayon, J., Ribereau-Gayon, P., Peynaud, E., Sudraud, P.** (1972). *Traité d'oenologie - Sciences et techniques du Vin, Analyse et contrôle des Vins. Dunod- Paris ; 1 : p 671*
- Sakat, S., Juvekar, A.R., & Gambhire, M. N.** (2010). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis coniculata* Linn. *International journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 146-155.
- Sandur, S. K et al, (2007) in Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C et Pouységu, L.** (2011). *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. Angewandte Chemie*, 50 : 586-621.
- Sangeetha, M., K, Kousalya., Lavanya, R., Cherukuru, S., Chamundeeswari, D., Uma , Maheswara .R.** (2011). In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of Leaves of *Cleo Dendron Inerme*. *RJPBCS ; 2 (1): 822-827.*
- Schulze-Koops, H., Kalden, J.R.** (2001). The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*:15; 677-691.
- Seeman, P.** (1967). Transient holes in the erythrocyte membrane during hypotonic hemolysis and stable holes in the membrane after lysis by saponin and lysolecithin. *The Journal of cell biology*, 32(1), 55-70.
- Shabana M.M., Mirhom Y.W., Genenah A.A., Aboutabl E.A. et Amer H.A.,** 1990- Study into wild Egyptian plants of potential medicinal activity. Ninth communication: hypoglycaemic activity of some selected plants in normal fasting and alloxanised rats. *Arch Exp Veterinarmed*. Vol. 44, N° 3, pp.389-394.
- Shendkar, A.K., Chaudhari, S.G., Shendkar, Y.K.** (2014). In vitro antiarthritic activity of *Withania coagulans* dunal fruits. *IAJPR* 4: 915-924.
- Soderstrom, K. et al.** (2010). Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*:107; 13028-13033.
- Song F.L., Gan R.Y., Zhang Y., Qin Xiao, Kuang L. et Li H.B.,** (2010). total Phenolic Contents and Antioxidant Capacities of Selected Chinese Medicinal Plants. *Int. J. Mol. Sci*, Vol.11, pp. 2362 2372.
- Soni M.G, Carabin I.G., Griffiths J.C., et Burdock G.A.,** (2004). Safety of ephedra: lessons learned. *Toxicology Lettersn*, Vol. 150, pp. 97–110.

- Szekanecz, Z., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. & Koch, A.E.** (1998). Chemokines in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol*; 20; 115-132.
- Tabuti, J.R.S., Lye K.A. & Dhillon, S.S.** (2003). Traditional herbal drugs of Bulamogi, Uganda: plants, use and administration. *J. Ethnopharmacology* 88: 19-44.
- Takatoshi, Murase.,Noriaki, Kume., Tadashi, Hase., Yusuke, Shibuya., Yoshinori, Nishizawa., Ichiro, Tokimitsu., Toru, Kita.** (1999). Gallates inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of leukocyte adhesion molecules in vascular endothelial cells. *ArteriosclerThrombVascBiol*;19: 1412-1420.
- Takemura, S. et al.** (2001).Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol*:167; 1072-1080.
- Tamada M., Endo E., Hikino H. et Eabuto C.,** (1979). structure of ephedradine a, a hypotnsive principle of Ephedra roots. *Tetrahedron letters*, n°.10, pp. 873-876.
- Timmermann B.N., Steelin C., Loewus F.A.,** (1984). Recent Advances in Phytochemistry Phytochemical Adaptations to Stress .Plenum Press: New York, pp. 273–220.
- Vadivu, R. & Lakshmi, K.S.** (2008). In vitro and In vivo anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchnensis* (Lour) Moore ssp *laurina*. *Bangladesh J Pharmacol* 2008; 3: 121-124.
- Vencovsky, J. et al.** (2003).Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* : 62; 427-430.
- Vita, S., Zaja, F., Sacco, S., De Candia, A., Fanin, R., Ferraccioli, G.** (2016). Efficacy of selective B cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis: evidence for a pathogeneticrole of B cells. *Arthritis Rheum*; 46:2029–2033.
- Vossenaar, E.R. et al.** (2003).Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* :48 ; 2489-2500.
- Vundać V.B., Brantner A.H. et Plazibat M.,** (2007). Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food chemistry.*, Vol. 104, pp. 1277–1281.
- Wang Q., Yang Y., Zhao X., Zhu B., Nan P., Zhao J., Wang L., Chen F.,Liu Z. et Zhong Y.,** (2006). Chemical variation in the essential oil of *Ephedra sinica* from Northeastern China. *Food Chemistry*, Vol. 98, pp. 52–58.

- Weyand, C.M., Mac Carthy, T.G., Goronzy, J.J.** (2015). Correlation between disease phenotype and genetic heterogeneity in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*;95:2120–2126.
- Winter, C. A., Risley, E. A., Nuss, G. W.** (1962). Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay of anti-inflammatory drug. *Proc Soc Exp Biol Med*:111; 544–547.
- Yamanaka, H. et al.** (2000). Serum matrix metalloproteinase 3 as a predictor of the degree of joint destruction during the six months after measurement, in patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*:43; 852-858.
- Yoshihara, Y. et al.** (2000). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*: 59; 455-461.
- Zang X., Shang M., Xu F., Liang J., Wang X., Mikage M. et Cai S.,** (2013). A-Type Proanthocyanidins from the Stems of *Ephedra sinica* (Ephedraceae) and Their Antimicrobial Activities. *Molecules*, Vol.18, N°5, pp. 5172-5189.
- Zeggwagh AA, Lahlou Y, Bousliman Y.**(2013).service de réanimation Médicale et de Toxicologie Clinique-Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat-Maroc.