

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université ABDERRAHMANE MIRA de Bejaia
Faculté des sciences de la Nature et de la Vie
Département de biologie physico-chimie.

Mémoire de master

Filière : Biologie

Option : Génétique appliquée

Thème

Activité anti-inflammatoire et évaluation
de la toxicité *in vivo* des extraits
éthanoliques de l'écorce de
Ulmus campestris

Présenté par :

M^{elle} Ziane Keltoum

M^r Tiab SidAli

Membre de jury :

Présidente : M^{elle} Tahiri. O

Promotrice : Mm Ouahmed. H

Co-promoteur : M^{elle} Moulaoui. K

Examinatrice 1 : Mm Debbache. N

Examinatrice 2 : Mm Atmani. D

Grade et lieu

MAA. U.A.MIRA

MAA. U.A.MIRA

Dr. U.A.MIRA

MAA. U.A.MIRA

MCB. U.A.MIRA

Année
2012/2013

Remerciements

Nos remerciements vont d'abord à Dieu tout puissant de nous avoir donné la force et la volonté de réaliser ce travail

Nous tenons à remercier notre promotrice, Madame Ouahmed, pour l'effort fourni, les conseils prodigués et sa persévérance dans notre suivi.

Nous exprimons toute notre gratitude à mademoiselle Moulaoui qui nous a beaucoup aidé à la réalisation de ce travail

Nos remerciements vont à tout les membres du laboratoire de génétique de l'université de Béjaïa de l'aide qu'ils nous ont préconisé et De l'encadrement éclairé dans la réalisation de notre mémoire

Nos remerciements s'adressent également à l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation, qu'ils retrouvent à travers ces lignes l'expression de nos grandes reconnaissances.

A toutes personnes qui à participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à:

- *A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*
- *Mes frères et mes soeurs Nourdine, Ali, Saïda, Zahia, Dalila, Rabiha.*
- *Mes coupines Hana, Sonia, Siham, Zaza, Zina,*
- *Mes amis Ouerdia, Kaïssa, Souhila, Lina, Biba, Djazia, Fairouz, Nedjma et Fatiha*
- *A mon neveu que je l'adore beaucoup Aymen.*
- *Mon binôme Sidali de m'avoir soutenu*
- *Et à toutes personnes qui m'ont soutenu durant l'élaboration de ce travail.*

Keltoum

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à:

- *La mémoire de mes grands-parents que Dieu les accueille dans son vaste paradis.*
- *La Mémoire de mon grand-père Slimane qui a toujours cru en moi.*
- *A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*
- *Mes frères et mes soeurs, Nassim, Amine, Kamel, Anissa, Zina, Ghania, Lynda.*
- *Mes cousines Yasmine, amel, samia*
- *Mes amis Samy, mazigh, youba, yasmine, sarah, camy.*
- *Mes camarades fatima, nabila, Nabil, lynda, yasmine et particulièrement à ma chère Selma*
- *Mon binôme Keltoum de m'avoir soutenu*
- *Tonton Kiki Et à toutes personnes qui m'ont soutenu durant l'élaboration de ce travail.*

Sidali

Sommaire

Introduction générale	1
Partie I : Etude bibliographique	
Chapitre I : l'inflammation	3
I-1-Définition de l'inflammation	3
I-2- Physiopathologie de l'inflammation	3
I-3- Les médiateurs de l'inflammation	4
I-4- Les cellules de l'inflammation	8
I-5-Les types de l'inflammation	8
I-6-Les phases de l'inflammation	9
I-6-1-Phase vasculaire	9
I-6-2-Phase cellulaire	12
I-6-3-Phase de réparation.....	12
I-7-La carragénine et l'inflammation.....	13
I-7-1-Généralité sur la carragénine.....	13
I-7-2-Le mécanisme inflammatoire induit par la carragénine.....	14
Chapitre II : activité anti-inflammatoire	16
II-1-Généralités	16
II-2-Les anti-inflammatoires stéroïdiens	16
II-2-1-Mode d'action des glucocorticoïdes.....	17
II-3-Les anti-inflammatoires non stéroïdiens	19
II-3-1-Mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	19
II-3-2-Classification des AINS	21

II-3-3-Exemple de mode d'action du diclofénac	22
II-4-Anti-inflammatoire d'origine végétale	23
II-4-1-Les polyphénols.....	23
II-4-2- Les polyphénols et l'inflammation	25
II-4-2-1-Propriétés anti-inflammatoire des flavonoïdes	26
II-4-2-2-Relation entre la structure et la fonction des flavonoïdes	27
Partie II : Etude expérimentale	
Chapitre III : Matériels et méthodes.....31	
III-1- Matériels.....	31
III-1-1- Matériel animal et conditions d'élevage.....	31
III-1-2- Matériel végétal.....	31
III-1-3- Matériels de laboratoire	33
III-2- Méthodes	33
III-2-1- Préparation de l'extrait	33
III-2-2-Etude l'activité anti-inflammatoire	34
III-2-3- Etude de la toxicité aigüe.....	36
III-2-4- Etude statistique	37
Chapitre IV : Résultats et discussion38	
IV-1- Etude de l'activité anti-inflammatoire	38
IV-2- Toxicité aigüe	46
Conclusion générale.....	48
Références bibliographiques	

Liste des abbreviations

- ❖ **AA** : Acide Arachidonique
- ❖ **AC** : Acétylation
- ❖ **AINS** : Anti-Infammatoire Non Stéroïdien
- ❖ **AIS** : Anti-Infammatoire Stéroïdien
- ❖ **Arg**: Argenine
- ❖ **Bcl-10** : B-cell lymphoma 10
- ❖ **CARD**: Caspase Activating and Recruitment Domain.
- ❖ **CBP**: Calmoduline Binding Protein
- ❖ **CGN** : Carragenine
- ❖ **COX** : Cyclo-Oxygénase
- ❖ **COXIBS** : COX-2 Inhibitor Sélectiv
- ❖ **C3** : Complement 3
- ❖ **C5** : Complement 5
- ❖ **ERO** : Espece Reactive de l'Oxygene
- ❖ **FT** : Facteur de Transcription
- ❖ **GCs** : Glucocorticoids
- ❖ **GSH** : Glutathione (réduit)
- ❖ **GSSG** : Glutathion S-S (oxide)
- ❖ **HDAC** : Histone Deacetylases
- ❖ **HMGB1**: High Mobility Group Protein B1.
- ❖ **HPLC**: Chromatographie Liquide de Haute Performance
- ❖ **4-HNE**: 4-hydroxy-2-nonenal
- ❖ **ICAM-1** : Intercellular Adhesion Molecule-1
- ❖ **IgG**: Immunoglobuline G
- ❖ **iNOS** : inductible Nitric Oxide Synthases
- ❖ **IκB** : Inhibitor of κB
- ❖ **IKK** : I-κB kinase
- ❖ **IL**: Interleukine
- ❖ **Keap1** : Kech-like Ech Associated Proteins 1
- ❖ **LOX**: Lipo-Oxygénase
- ❖ **LPS** : Lipopolysaccharides
- ❖ **LTB4**: Leukotriene B4

- ❖ **LTD4** : Leukotriene D4
- ❖ **MALT1** : Mucosa Associated Lymphoid Tissue
- ❖ **MAP** : Microtubule associated proteins
- ❖ **MCP** : Monocyte Chemoattractant Protein
- ❖ **MIP-1** : Macrophage Inflammatory Protein-1
- ❖ **MnSOD** : Manganese Superoxide Dismutase
- ❖ **NF- κ B** : Facteur Nucléaire -kappa B
- ❖ **NMRI**: Naval Medical Research Institute
- ❖ **NOD**: Nucleotide Oligomerization Domain.
- ❖ **Nrf2** : NF-E2-related factor
- ❖ **P** : Phosphorylation
- ❖ **PAF** : Platelet Activating Factor
- ❖ **PGE2** : Prostaglandine E2
- ❖ **PLA2** : Phospholipase A2
- ❖ **PNN** : Polynucléaires Neutrophil
- ❖ **Rel**: Réticulum endoplasmique lisse
- ❖ **ROS**: Reactive Oxygen Species
- ❖ **SEM** : Standard Error of Mean
- ❖ **SNC**: System Nerveux Central
- ❖ **SI**: Système Immunitaire
- ❖ **TNF α** : Tumor Necrosis Factor- α
- ❖ **TRAFs**: Tumor necrosis Factor Receptor-Associated Factors .
- ❖ **VCAM-1** : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
- ❖ **Ub** : Ubiquitination
- ❖ **Val**: Valine

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Numéro de la page
1	Cascade arachidonique	6
2	Les phases de l'inflammation aigüe	9
3	Vasodilatation et exsudation lors de la phase vasculaire	10
4	Recrutement de leucocytes aux sites d'infection	12
5	Schéma récapitulatif de la réaction inflammatoire	13
6	Structure d'une unité de la λ -carragénine	13
7	Activation de la voie de NF-KB par la λ -carragénine	15
8	Structures des GCs naturels et de synthèses.	18
9	Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens	20
10	Représentation schématique de l'inhibition sélective des coxibs	21
11	Structure de quelques AINS	22
12	Cible moléculaire du diclofénac	23
13	Classification et structure des polyphénols	24
14	Différentes cibles des flavonoïdes et des polyphénols sur la réaction inflammatoire	27
15	Structure générale de trois sous classe de flavonoïdes	28
16	Structure de quelques flavonoïdes et leurs effets sur l'inflammation	30
17	Image photographique de l'écorce de <i>Ulmus campestris</i>	31
18	Image photographique de l'orme champêtre	32
19	Le pléthysmomètre	33
20	Lot des souris en cage	34
21	Injection de carragénine (a) et administration orale des solutions (b)	35
22	Mesure du volume de la patte de souris par le pléthysmomètre (a, b)	36
23	Image de l'œdème de la patte induit par la carragénine à 1h (a) et à 3h (b)	38
24	Courbe de l'évolution de l'œdème inflammatoire en fonction du temps	40
25	Inhibition de l'œdème induit par la carragénine à la 6eme heure	42

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	Numéro de la page
I	Les principaux médiateurs de la réaction inflammatoire	5
II	Les principales cytokines de la réaction inflammatoire	7
III	Classification des AINS	21
IV	Différentes plantes médicinales et leurs composées phénoliques	25
V	Classification taxonomique de <i>Ulmus campestris</i>	32
VI	Tableau des volumes de la patte	39
VII	Tableau de pourcentage d'augmentation d'œdème en fonction du temps	39
VIII	Effet anti-inflammatoire des extraits éthanolique de quelques plantes médicinales	44
IX	Résultats du test de la toxicité aigüe de l'extrait éthanolique d'écorce de <i>Ulmus campestris</i>	46

Introduction

La réaction inflammatoire est un mécanisme élaboré par l'organisme et nécessaire au maintien de son intégrité. Cependant, ce processus complexe est délétère pour les tissus et les organes, et peut suivant son étiologie, se prolonger dans le temps. En effet, de très nombreuses pathologies à caractère chronique présentent une composante inflammatoire telle que la polyarthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, la goutte, ou encore le diabète (**Cohen et Jacquot, 2008**).

Le traitement actuel de l'inflammation fait appel à des molécules de synthèses (anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens) issues de la pharmacopée industrielle qui, bien qu'étant efficaces présentent le plus souvent une variété d'effets indésirables lourds de conséquences et parfois même causes de mortalités (troubles digestifs, rénaux, vasculaires et endocriniens...etc.), ce qui place cette classe thérapeutique au premier rang de la pathologie iatrogène médicamenteuse (**Thiféfin, 1991**).

Depuis plus de 6000 ans, L'utilisation thérapeutique des plantes médicinales est partie intégrante des traditions de toutes les cultures et de toutes les civilisations. L'évolution des techniques, des méthodes de recherche et d'extraction en biologie, biochimie et pharmacologie, a fortement contribué à la valorisation thérapeutique de ces plantes (**Roux et catier, 2007**). Ainsi, l'étude systématique de la biodiversité végétale à des fins thérapeutiques, dénommée pharmacognosie, a suscité de grands espoirs grâce à la découverte, et à l'isolement de plusieurs molécules végétales actives et rares comme les polyphénols. Un regain d'intérêt de plus en plus croissant, auprès de la communauté scientifique pour ces principes actifs a démarré afin de passer au crible un plus grand nombre d'espèces réparties dans le règne végétal (**Riahi et al., 2011**).

Ulmus campestris est une plante médicinale retrouvée dans la région de Bejaia. L'écorce de cette plante thérapeutique est connue pour ces vertus de diurétique, d'anti-diarrhéiques, d'antirhumatisme et en enfin d'anti-inflammatoire (**Belouaed et al., 2001**). L'évaluation des activités pharmacologiques de cet Ulmaceae, dans un cadre expérimentale, pourrait contribuer à l'identification et à la caractérisation de nouvelles molécules bioactives extraites de son écorce.

Dans cette perspective, cette investigation tentera d'apporter une contribution à l'étude d'une application traditionnelle de *Ulmus campestris* utilisé dans le traitement de l'inflammation. Pour cela, ce travail sera développé selon le plan suivant:

Dans un premier temps, une série de rappels sera rapporté sur le processus inflammatoire, cette partie exposera les composantes ainsi que le déroulement de l'inflammation. De plus, cette partie exhibera les grands concepts relatifs aux mécanismes d'actions des anti-inflammatoires synthétiques et décrire quelques mécanismes d'actions de molécules pures extraites à partir de plantes médicinales.

Dans un deuxième temps les résultats de ces travaux seront présentés et interprétés, dans le but d'évaluer l'activité anti-inflammatoire et la toxicité aiguë *in vivo*, de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris*.

Partie I

Etude bibliographique

Chapitre I :

Inflammation

I-1-Définition de l'inflammation :

La réaction inflammatoire est l'ensemble des moyens mis en jeu lors d'une modification de l'organisme, en général une agression, et nécessaires au maintien de son intégrité (**Miossec, 2003**). Signature de la réponse immunitaire innée, la réaction inflammatoire agit d'abord comme un moyen d'alerte des centres de surveillance (système immunitaire adaptatif) mais aussi comme un moyen de lutte contre l'agression. Il s'agit d'un mécanisme universel de défense et de réparation tissulaire après agression (**Franco et al., 2009**).

L'inflammation peut être causée par des agressions physiques (comme le chaud, le froid, les radiations ionisantes), chimiques (occasionnées par des composés acides ou basiques, des toxines bactériennes ou la carragénine). Elle peut être la conséquence d'une infection bactérienne, virale ou parasitaire, ou bien être provoquée par une réaction immunitaire secondaire à la réintroduction dans l'organisme d'un antigène (allergie) tel qu'un antibiotique. Elle est enfin souvent la conséquence d'une nécrose tissulaire, elle-même secondaire à de nombreuses causes (**Diabold et al., 1995**).

La finalité du processus inflammatoire est triple : détruire l'agent agresseur, détruire les tissus lésés et réparer les dégâts. Ceux-ci impliquent la mise en œuvre de différentes fonctions dans un ordre très précis entre autre des modifications hémodynamique (comme des phénomènes vasomoteurs), humorales et tissulaires. L'interaction entre ces événements permet l'auto-entretien et l'amplification de la réponse inflammatoire, aussi un déséquilibre dans l'une de ces fonctions peut entraîner un état pathologique (**Cavaillon, 1995**).

I-2-Physiopathologie de l'inflammation :

Bien que bénéfique pour l'organisme, le processus inflammatoire est accompagné de symptômes pénibles, certains sont :

- Locaux (rougeur, chaleur, tuméfaction, douleur), provoqué par l'activité de médiateurs chimiques, dits pro-inflammatoires, dont certains (histamine) ont pour effet des changements hémodynamiques essentiellement vasodilatateurs, provoquant ainsi un œdème accompagné d'une rougeur, témoignant d'un afflux sanguin important au niveau du foyer inflammatoire (site de l'agression). L'augmentation de la chaleur et l'apparition de douleurs sont provoquées par d'autres médiateurs pro-inflammatoires, qui agiraient sur le système nerveux périphérique (**Haeffner-Cavaillon, 1998**).

- Généraux (fièvre, asthénie, anorexie,) témoignant d'une activité régulatrice de ces médiateurs pro-inflammatoires sur le système nerveux central, en agissant sur le centre de thermorégulation d'hypothalamus ainsi que sur la production d'hormones anorexigènes telle que la leptine (**Muster, 2005**).

I-3-Les médiateurs de l'inflammation :

Face à l'agression, le système immunitaire (SI) se doit de fournir une réponse rapide et efficace ; pour cela, il dispose de moyens immédiatement disponibles. Ainsi la rapidité du SI a initié une réponse inflammatoire témoignant d'une grande coordination de ses effecteurs (cellulaires) (**Marfaing-koka, 1998**).

Cet agencement est le fruit d'une régulation humorale exécutée donc par des facteurs solubles ; en effet, le SI dispose d'un large éventail de molécules à activité para, auto, ou endocrine, ce sont les médiateurs de l'inflammation (**Cavaillon, 1995**).

La spécificité de ces médiateurs est en corrélation directe avec la distribution cellulaire de leurs récepteurs sécrétés par les cellules immunitaires, ces substances sont chargées d'induire une réponse inflammatoire, de téléguidier les cellules immunitaires sur le site de l'agression, de les arrêter, de les activer ou de les inactiver selon l'événement déclenchant et le contexte de la réaction inflammatoire (infectieux, traumatique, allergique...), le profil de médiateurs produits, influe directement sur la composition de l'infiltrat cellulaire (foyer inflammatoire) (**Cynober, 2000**).

Les principaux médiateurs pro-inflammatoires sont résumés dans le tableau I. Ces médiateurs sont produits, pour la plupart, par les cellules de l'immunité. D'autres sont issus de cascades protéolytiques au niveau du plasma sanguin comme la bradykinine ou les fractions du complément.

Tableau I: Les principaux médiateurs de la réaction inflammatoire (Pasquier, 1995; Leone et al., 2003).

Médiateurs	Origine	Effet physiologique
Amine vaso-actif		
Histamine Sérotonine (5-HT)	Mastocytes, Plaquettes	perméabilité vasculaire, contraction des muscles lisses, vasodilatation, chimiotactisme, formation d'œdème.
Prostanoïde (Figure 1)		
Prostaglandines E2 (voie cyclo-oxygénase)	Mastocytes, PNN, Cellule endothéliales, macrophage.	Synergie avec l'histamine et la bradykinine ↑ perméabilité vasculaire, vasodilatation, œdème. Sensibilise les nocicepteurs (douleurs), inhibe l'activité des lymphocytes T suppresseur, chimiotactisme des leucocytes, fièvre (action sur l'hypothalamus)
Leucotriène B4 (Voie de la lipooxygénase)	mastocyte, PNN	Synergie avec PGE2 dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire, chimiotactisme des PNN, active les phagocytes, pyrogène.
Leucotriène D4 (Voie de la lipooxygénase)	Mastocyte, macrophage	contraction des muscles lisses, Augmentation de la perméabilité vasculaire.
Espèce réactive de l'oxygène		
Monoxyde d'azote (NO, voie iNOS synthase)	neutrophile et macrophage	vasodilatation, œdème, manifestation allergique (érythème).
H ₂ O ₂ , OH, O ⁻²	Explosion oxydative des PMN, macrophage	désorganiser les membranes cellulaires et de favoriser la cytolyse, entretient l'inflammation, dégrade les biomolécules
Médiateur plasmatique		
bradykinine	Cascade des kinines	perméabilité capillaire, contraction des muscles lisses, vasodilatation, vasoconstriction nociception.
C3a* et C5a	Complément C3 et C5	Dégranulation des mastocytes*, contraction des muscles lisses* chimiotactisme et activation des PNN et des macrophages perméabilité capillaire

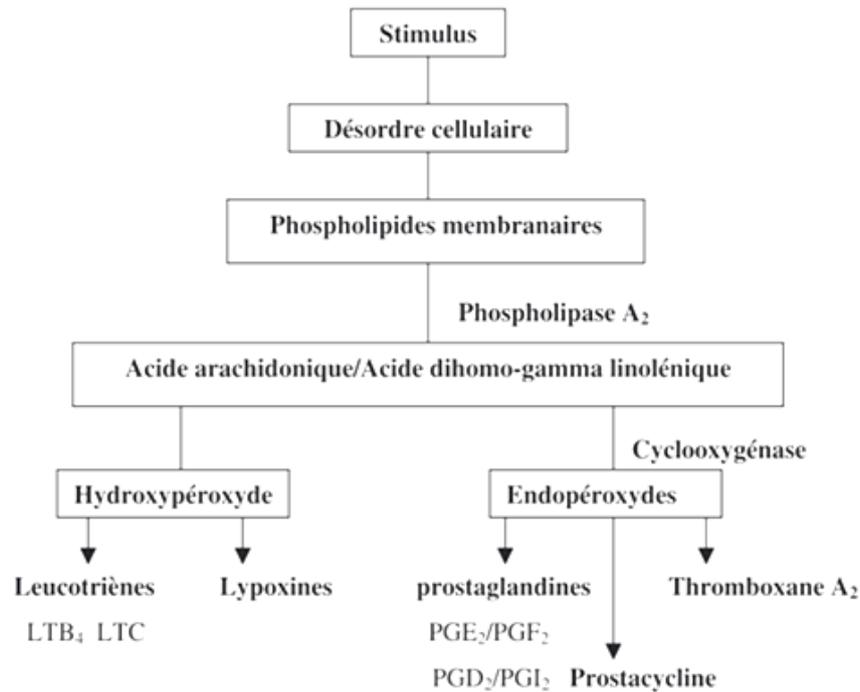


Figure 1 : Cascade arachidonique (Timbo, 2003).

Les prostaglandines (PGs) sont des médiateurs lipidique issus du métabolisme de l'acide arachidonique au niveau membranaire, comme le montre la figure 1, divers stimuli active la phospholipase A2 (PLA2) qui relargue l'acide arachidonique (A.A) des phospholipides. L'A.A est alors convertis en prostaglandines par la cyclo-oxygénase (principalement par l'isoforme COX-2 dans les cellules immunitaires). La nature exacte des prostaglandines produites est déterminée par l'expression dépendante du type cellulaire, de différentes prostaglandines synthétase qui convertissent le produit de la réaction COX-2. Les prostaglandines diffusent et sont reconnues par différents récepteurs spécifiques sur les cellules cibles voisines (Male et al., 2007).

La réaction inflammatoire comprend la production de cytokines qui exercent des actions locales et systémiques. Le contrôle de l'inflammation dépend d'un équilibre subtil entre cytokines pro- et anti-inflammatoires. Le tableau II montre les principales cytokines de la réaction inflammatoire (Cynober, 2000).

Tableau II: Les principales cytokines de la réaction inflammatoire (Male et al., 2007; Diouf, 1991; Capron, 1998).

Cytokine	origine	Effet physiologique
Pro-inflammatoire		
Cytokines IL-1 β (Principale)	Majorité des leucocytes, cellules endothéliales et fibroblastes.	Rôle central dans la modulation de l'expression génique d'un grand nombre d'enzyme et médiateurs à effet pro-inflammatoire de l'inflammation (IL8, molécule d'adhérence, iNOS, récepteurs des agents vasodilatateurs, prostaglandines).
TNF α	Majorité des leucocytes, cellule endothéliales, fibroblastes	Rôle central, agit en synergie avec l'IL1 β , effet systémique (agit sur l'hypothalamus) comme la fièvre, l'anorexie (régulation de la leptine), \uparrow la cytotoxicité des phagocytes. Exerce un rétrocontrôle négatif systémique sur l'inflammation.
IL-8 (Chimiokine)	Monocytes macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales	Induit le chimiotactisme et l'activation des PNN pendant la migration leucocytaire. Induisent la synthèse de prostanoides, de NO et d'Espèces réactives de l'oxygène (ERO).
Anti-inflammatoire		
IL-6	monocytes, fibroblastes, lymphocyte T CD4, hépatocytes	Induction de molécules anti-inflammatoires tels que, les protéines de la phase aiguë du foie, les anti-protéases, les enzymes antioxydants. Exerce un effet inhibiteur sur les cytokines pro-inflammatoire.
TGF β	macrophage	Effet anti-inflammatoire sur les cellules endothéliales et les PNN

I-4-Les cellules de l'inflammation :

Le processus inflammatoire se déroule dans le tissu conjonctif. Les principales cellules participant au déclenchement des diverses phases de l'inflammation sont :

- les cellules endothéliales du réseau de la microcirculation, en particulier des capillaires et veinules.
- les cellules véhiculées par le sang : plaquettes, polynucléaires neutrophiles (PNN), éosinophiles et basophiles, monocytes, lymphocytes .
- les cellules du tissu conjonctif : mastocytes, macrophages-histiocytes, fibroblastes.

Ces cellules vont collaborer les unes avec les autres selon des séquences successives, grâce à la production des médiateurs pro-inflammatoires actives libérées dans le sang ou le tissu conjonctif : enzymes, cytokines immunoglobulines, complément, et de protéines servant de récepteurs (**Diebold et al., 1995**).

I-5-Les types de l'inflammation :

Selon la chronicité et la sévérité de l'inflammation cette dernière se divise en deux types

I-5-1-L'inflammation aiguë :

L'inflammation aiguë ou l'inflammation primaire est la réponse immédiate à un agent agresseur, elle est de courte durée et peut s'étendre de quelques jours ou quelques semaines. Elle est d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculaire intenses. C'est un processus dynamique comportant plusieurs étapes, de la réaction vasculaire à la phase de réparation et de cicatrisation (**Crouzille et siebert, 2010**). Les sites inflammatoires aigües sont infiltrés surtout de neutrophiles et de macrophage (**Male et al., 2007**).

I-5-2-L'inflammation chronique :

L'inflammation chronique est un processus physiopathologique complexe caractérisé à la fois par des facteurs pathologiques et temporels (elle dure des semaines voire des années, contrairement à l'inflammation aiguë qui dure quelques jours). Les sites inflammatoires chroniques sont riches en macrophages, cellules cytotoxique et même de cellules β (cellule de l'immunité adaptative) (**Male et al., 2007**).

I-6-Les phases de l'inflammation aigüe :

Comme résume la figure 2, l'inflammation aigüe est caractérisée par trois phases principales : une phase vasculaire, une phase cellulaire et une phase de réparation (Pasquier, 1995).

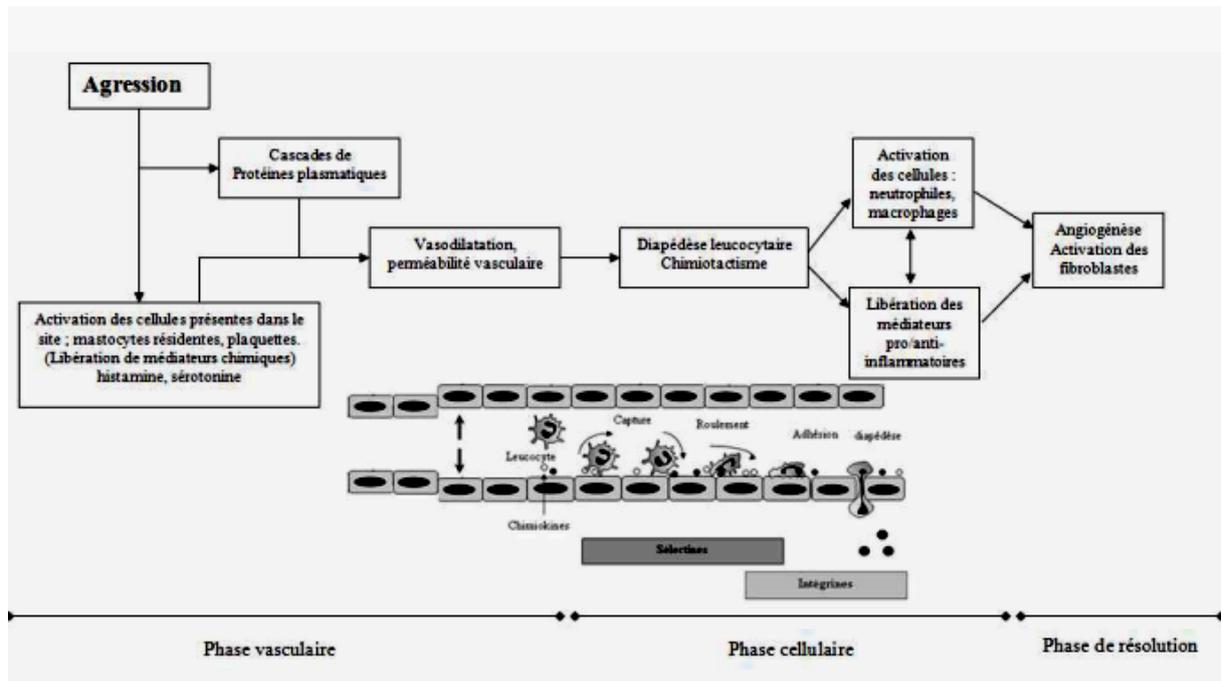


Figure 2 : Les phases de l'inflammation aigüe (Chevalier et al., 2005).

I-6-1-Phase vasculaire :

Le déclenchement de cette phase se traduit par une tuméfaction locale, une tension douloureuse (Diebold et al., 1995). Elle est caractérisée par une vasodilatation artérielle entraînant un érythème, un dégagement de chaleur locale. Il se produit une altération des micro capillaires par relâchement des cytokines et des substances vaso-actives (IL8, IL1 β , TNF α , 5-HT, histamine, bradykinine, PGs, NO et dérivés du complément) entraînant par la suite, l'exsudation des cellules du plasma vers les tissus (Cohen, 1990).

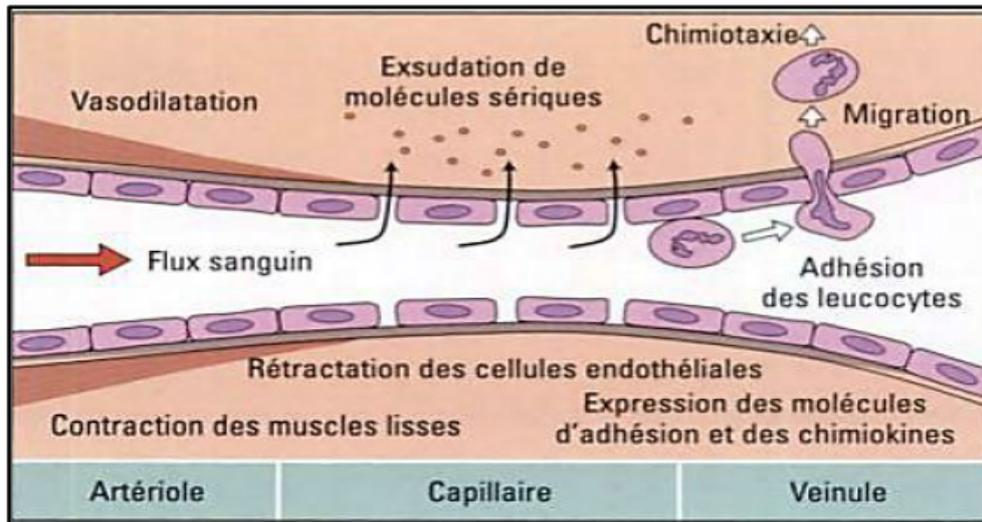


Figure 3 : Vasodilatation et exsudation lors de la phase vasculaire (Male, 2005).

D'après la figure 3, trois phénomènes vont se succéder : congestion active, œdème ou exsudation et diapédèse leucocytaire

I-6-1-1-La congestion active :

Elle se définit par l'augmentation de la quantité de sang artériel arrivant dans le territoire de l'agression. Les principaux responsables de cette congestion active sont l'histamine et la 5-HT libérées par les mastocytes et les plaquettes (Diebold *et al.*, 1995).

L'augmentation de la perméabilité vasculaire, en plus de permettre l'afflux de cellules et de protéines solubles, déclenche deux cascades protéolytiques. En produisant la bradykinine, la cascade des kinines, augmente encore la perméabilité vasculaire, ainsi qu'à l'aide de l'effet potentialisateur des médiateurs lipidiques (issus du métabolisme de l'acide arachidonique, figure 1) la perméabilité des vaisseaux atteint un stade accru, tandis que la cascade de coagulation conduit à la formation de caillots qui va limiter la propagation du stimulus phlogogène (Franco *et al.*, 2009).

I-6-1-2-L'œdème :

L'œdème est dû à l'augmentation du liquide interstitiel au niveau de la lésion en lien avec la plus grande perméabilité des vaisseaux, qui laissent passer au travers de l'endothélium vasculaire des leucocytes, mais aussi un exsudat riche en protéines (Crouzille et siebert, 2010).

Les amines vaso-actifs continuent à produire leurs effets et provoquent la rétraction des cellules endothéliales, ces dernières, se gonflent et se globulisent par pénétration de l'exsudat.

L'œdème inflammatoire se traduit par l'infiltration du tissu conjonctif par un liquide riche en protéines provenant du sang contenu dans les vaisseaux sanguins. Cet œdème inflammatoire (encore appelé exsudat) est riche en albumine, fibrinogène, facteurs de coagulation, enzymes diverses, immunoglobulines, et protéines de phase aiguë (issues du foie), ces dernières servent au bon déroulement de l'inflammation. Tous ces événements seraient responsables de gonflements locaux (**Crouzille et siebert, 2010**).

I-6-1-3-La diapédèse leucocytaire :

Ce terme décrit la traversée des leucocytes de la paroi des vaisseaux sanguins (capillaires et veinules d'origine). Les leucocytes qui présentent ce phénomène sont d'abord des polynucléaires surtout neutrophiles (PNN). La diapédèse des PNN débute dans les premières heures du processus inflammatoire, prédomine pendant 2 jours et cesse entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour (**Diebold et al., 1995**). Les monocytes prennent ensuite le relais et amorcent le passage à la phase cellulaire de l'inflammation, en se spécialisant en macrophages.

La diapédèse leucocytaire s'effectue grâce à des interactions moléculaires, entre les cellules endothéliales et les leucocytes (**Male et al., 2007**).

La (Figure 5) décrit le recrutement des leucocytes vers le foyer inflammatoire. En réponse aux cytokines pro-inflammatoires (TNF α et IL1 β), les cellules endothéliales expriment à leurs surfaces des molécules d'adhérence (sélectine P et E) ainsi que des protéoglycanes (ligands des chimiokines) (**Male et al., 2007**).

Les chimiokines synthétisées tout au long de la phase vasculaire telle que l'IL8, se lient aux peptidoglycanes de la surface cellulaire qui s'étendent dans le vaisseau sanguin. Les leucocytes comme PNN circulent dans le vaisseau librement jusqu'à ce qu'ils entrent en contact avec les cellules endothéliales par l'intermédiaire des sélectines. L'interaction via ces molécules permet de ralentir le mouvement des leucocytes dans le fluide.

Les leucocytes entrent dans une phase de roulement jusqu'à ce qu'ils entrent en contact avec les chimiokines (liées à leurs protéoglycanes) via des récepteurs spécifiques. Le signal induit par cette interaction permet le changement de conformation des intégrines exprimées par les leucocytes (intégrines β 2 par les neutrophiles), ceci provoque l'adhérence irréversible

des leucocytes à l'endothélium (par liaisons des intégrines $\beta 2$ aux intégrines ICAM1 et VCAM1 des cellules endothéliales). Cette étape est suivie par la transmigration (diapédèse) des leucocytes entre deux cellules endothéliales (**Franco et al., 2009**).

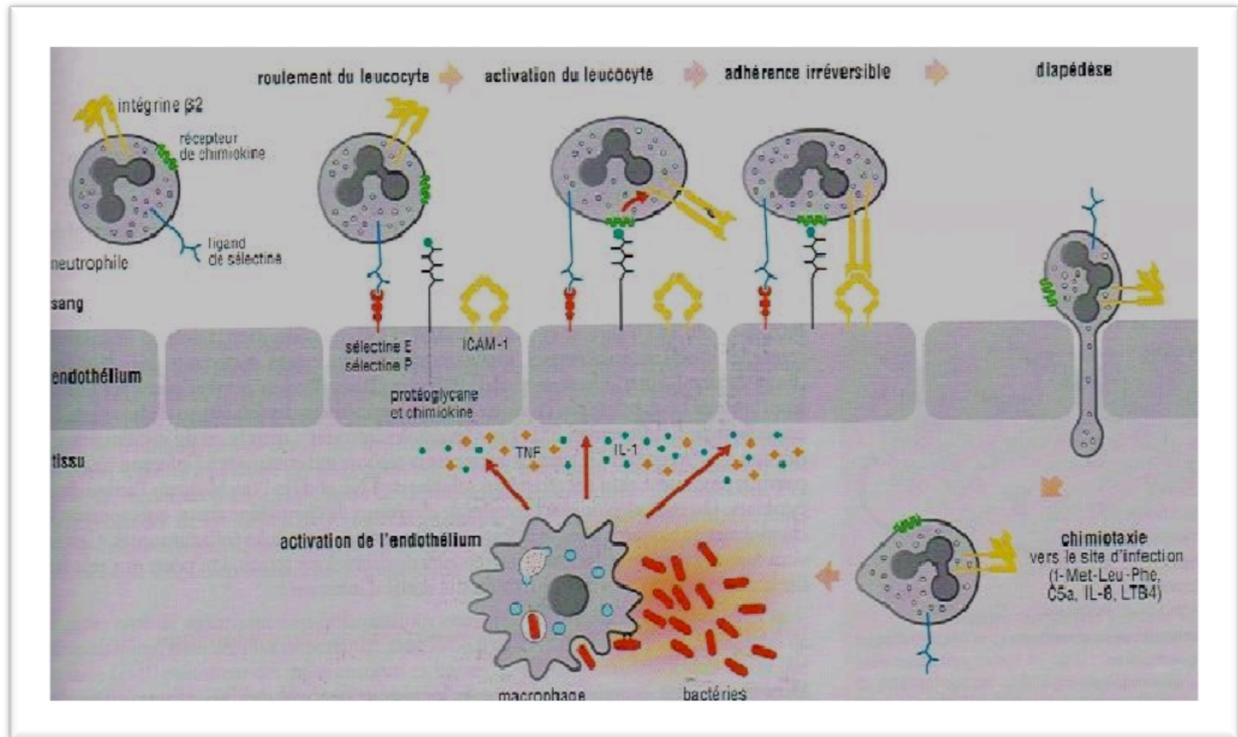


Figure 4: Recrutement de leucocytes aux site d'infection (**Franco et al., 2009**).

I-6-2-Phase cellulaire :

elle commence lorsque se trouvent rassemblées un grand nombre de plaquettes, de polynucléaire et de macrophages au site de l'inflammation ; ces effecteurs déversent leur contenu cellulaire et phagocytent les bactéries, les microcristaux et les débris de tissus nécrosés (**Pasquier, 1995**). La phagocytose est facilitée par les substances opsonisantes que sont les IgG et le C3a ayant des récepteurs sur la membrane de ces phagocytes (**Franco et al., 2009**).

I-6-3-Phase de réparation :

Cette phase a lieu que si les agents de l'inflammation et les produits engendrés ont pu être éliminés. Les PNN et les macrophages, n'étant plus stimulés par les agents pro-inflammatoires, cessent de libérer leurs contenus délétère. Les cellules fibroblastiques et endothéliales forment alors un tissu conjonctivo-vasculaire aboutissant à la cicatrisation (**Pasquier, 1995**).

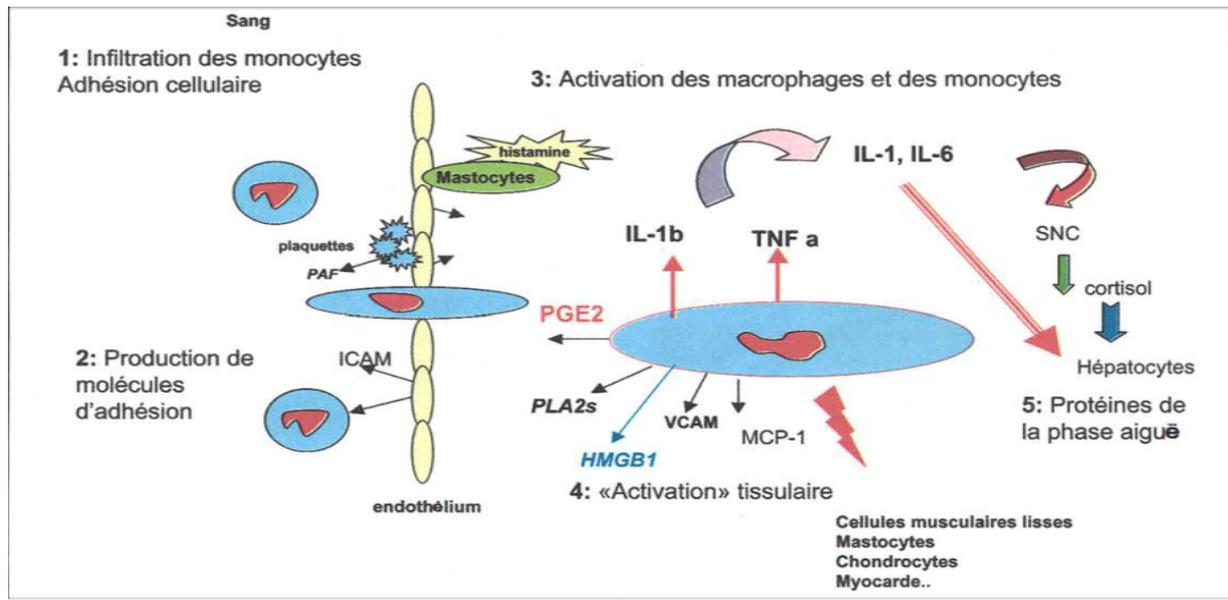


Figure 5 : Schéma récapitulatif de la réaction inflammatoire (Raymondjea, 2007).

La figure 5 résume le déroulement du processus inflammatoire rapporté plus haut, l'étape 5 montre la contribution du système nerveux centrale et hépatique à l'effet anti-inflammatoire par la production de protéine de la phase aiguë et de cortisol (Raymondjea, 2007).

I-7-La carragénine et l'inflammation :

Le point suivant présente la carragénine et ses mécanismes d'induction inflammatoire.

I-7-1-Généralité sur la carragénine :

La carragénine (ou carraghénane) (CGN) est un mucopolysaccharide sulfaté d'un haut poids moléculaire. La CGN provient de plusieurs espèces d'algues rouges (Rhodophyceae), tels que *Gigartina*, *Chondrus* et *Eucheuma*. Les formes les plus courantes de CGN sont lambda (λ), kappa (κ), et iota (ι). La CGN est composée d'unités di-saccharidiques de D-galactose mono- ou di-sulfaté, reliées entre elle par des liaisons osidiques.

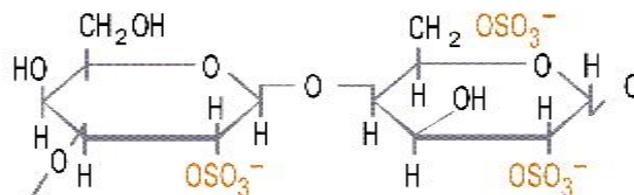


Figure 6 : Structure d'une unité de la λ -carragénine.

L'utilisation prédominante de la CGN a été l'amélioration de la texture des produits alimentaires ; cependant, de nombreux travaux, faits sur des modèles d'animaux, témoignent de la capacité de la λ -CGN à induire une inflammation.

La λ -CGN provoque une réaction inflammatoire reproductible et reste un produit chimique standard pour l'examen de l'inflammation aiguë et les effets des anti-inflammatoires ; en effet, l'induction œdémateuse de la patte arrière de souris ou de rats reste l'un des protocoles phare d'évaluation de l'activité anti-inflammatoire (**Borthakur et al., 2007**).

I-7-2-Le mécanisme inflammatoire induit par la λ -carragenine :

Lors de l'introduction de la λ -CGN dans l'organisme, cette dernière est rapidement détectée par les cellules immunitaires résidentes dans les tissus (macrophage, histiocytes...). Il semblerait que la reconnaissance dite "aspécifique" (immunité innée) du polysaccharide est réalisée grâce à une famille de récepteurs intracellulaires de peptidoglycane, hautement conservée au cours de l'évolution, qui sont les récepteurs de type NOD. L'activation de ce récepteur induit une voie transductionnelle distincte, aboutissant au recrutement du facteur de transcription NF- κ B (**Borthakur et al., 2007**).

Dans les cellules non stimulées, le NF- κ B est séquestré dans le cytosol comme un complexe inactif avec la protéine I κ B. Comme le montre la figure 9, en réponse à la stimulation de NOD2 (mécanisme inconnu), cette dernière recrute la protéine BCL-10 (caspase cytoplasmique jouant un rôle anti-apoptotique) par des interactions homotypiques au niveau de leurs domaines CARD (**Borthakur et al., 2007**).

Il s'en suit le recrutement et l'activation du signalosome IKK (par des mécanismes inconnus). Ce complexe trimérique est composé de deux sous-unités catalytique IK α , IK β et d'une sous-unité régulatrice NEMO, dès lors le complexe assemblé, est suivi par la phosphorylation des résidus sérines situés dans la partie NH₂-terminale de la protéine I κ B.

Cette phosphorylation fonctionne comme un signal d'ubiquitination, elle conduit à un changement de conformation de la protéine I κ B, ainsi qu'à sa dégradation par le protéasome, démasquant ainsi le signal de localisation nucléaire du dimère NF- κ B. Le NF- κ B est transloqué dans le noyau où il se fixe à son élément de réponse (**Leroy et al., 2009**).

Le facteur de transcription NF- κ B est un déterminant clé de la cascade inflammatoire et occupe un rôle central dans l'activation transcriptionnelle des gènes pro-inflammatoires.

La famille NF- κ B est composée de différents dimères protéiques appartenant à des membres de la famille Rel (regroupant p50, p52, p65, Rel B, et c-Rel).

La variabilité de la composition en dimères du NF- κ B pourrait contribuer à la spécificité de la régulation des gènes pro-inflammatoires ; ainsi un élément de réponse aux NF- κ B peut lier certains complexes NF- κ B, mais pas tous (Leroy *et al.*, 2009), il induit notamment la production de l'IL8, TNF α , l'IL1 β , l'histamine, NO (Liao *et al.*, 2012).

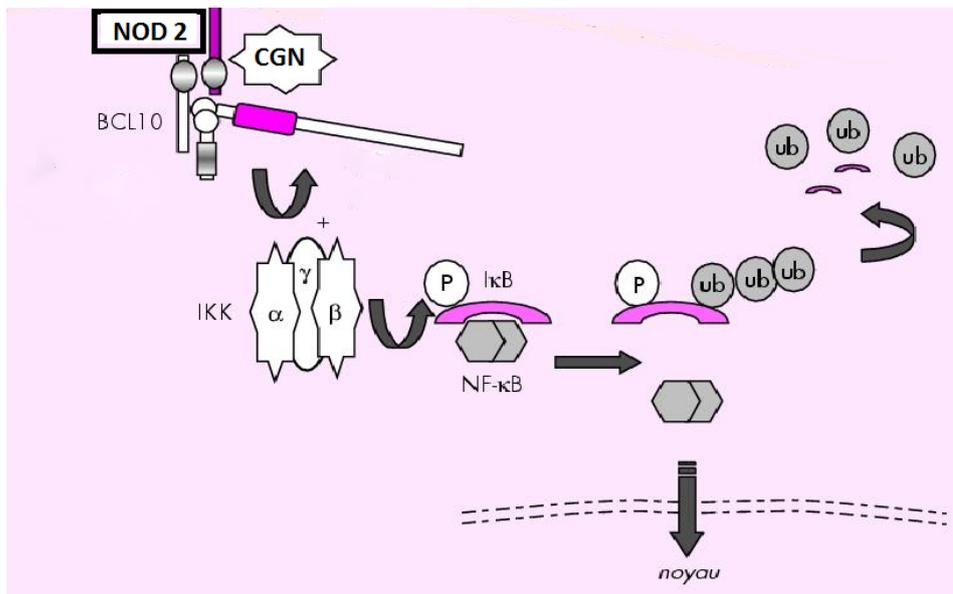


Figure 7 : Activation de la voie de NF- κ B par la λ -carragenine (Leroy *et al.*, 2009).

Chapitre II :

Activité anti-inflammatoire

II-1-Généralités :

Un anti-inflammatoire est un médicament qui agit sur les conséquences physiopathologiques de la réaction inflammatoire quelle qu'en soit l'origine.

La thérapeutique anti-inflammatoire est destinée à contrôler l'excès de réaction aspécifique des tissus et à éviter la transformation de la phase aiguë de l'inflammation en phase chronique.

Du fait de la grande variété des stimuli phlogogènes (immuns, microcristaux, infections, corps étranger, carragénine, traumatismes...) qui peuvent léser l'organisme, les anti-inflammatoires sont utilisés dans tous les domaines de la pathologie. Ils appartiennent à des classes chimiques différentes les unes des autres et sont souvent doués en outre d'une activité antipyrétique et analgésique.

Leur mode d'action est purement symptomatique puisque le cours de la maladie n'est en général pas arrêté. L'inflammation n'est qu'une conséquence et le traitement de son étiologie, dans la limite des connaissances, est le but principal du praticien (**Muster, 2005**).

Les anti-inflammatoires sont subdivisés en deux grandes classes : anti-inflammatoires stéroïdiens [AIS] (ou glucocorticoïdes) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens [AINS] (**Crouzille et Siebert, 2010**).

II-2-Les anti-inflammatoires stéroïdiens :

Les glucocorticoïdes (GCs) sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est assurée par la zone fasciculée des glandes surrénales (placées sous la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire). La synthèse des GCs s'effectue grâce à un arsenal enzymatique (Isomérase, convertase, hydroxylase...etc). Les GCs (comme le cortisol, hydroxy-cortisol) sont des hormones circulantes indispensables à la vie impliquées notamment dans le métabolisme glucidique, protéique et lipidique notamment (**Devillier, 1996**).

Le cortisol (principale GC surrénalien), tout comme ses analogues structuraux, possède des effets physiologiques variés et joue notamment un rôle dans la réponse au stress, en permettant la mobilisation rapide des réserves énergétiques de l'organisme. Son effet hyperglycémiant rend compte de son appellation de glucocorticoïde (**Faure, 2009**).

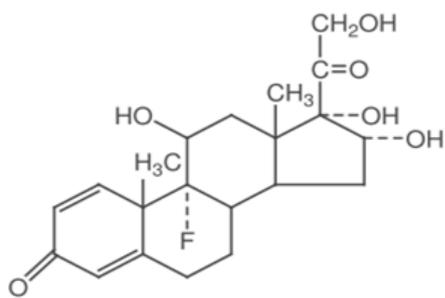
Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol. L'effet thérapeutique de ces molécules repose sur leurs propriétés anti-inflammatoires, qui font d'eux les produits les plus puissants dans ce domaine, mais aussi sur leurs propriétés immunosuppressives et antiallergiques (**Guilpain et Le Jeune, 2012**).

Les glucocorticoïdes de synthèse permettent, quant à eux, d'obtenir une meilleure activité anti-inflammatoire. Ils sont utilisés depuis plusieurs dizaines d'années dans la prise en charge de nombreuses pathologies présentant une composante inflammatoire ; cependant ils présentent de nombreux effets secondaires notamment, diabète sucré, dépression, hypertension et insuffisance surrénalienne (**Arnaud, 2009**).

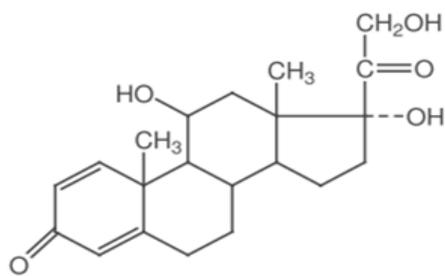
II-2-1-Mode d'action des glucocorticoïdes :

Contrairement aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les glucocorticoïdes sont capables d'inhiber toutes les phases de la réaction inflammatoire. Par leur action directe sur les vaisseaux, ils diminuent les phénomènes vasculaires de l'inflammation. Par leur effet antiprolifératif sur les monocytes-macrophages de tous les types, les lymphocytes, les plasmocytes, les fibroblastes et les PNN, ils inhibent les phénomènes cellulaires précoces et tardifs de l'inflammation (**Muster, 2005**).

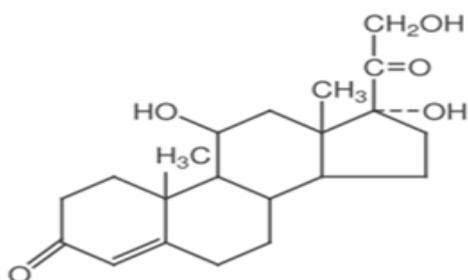
L'efficacité anti-inflammatoire des GCs résulte de leur capacité d'action sur la majeure partie des cellules impliquées dans la réaction inflammatoire et sur la synthèse de nombreux médiateurs de l'inflammation ; en effet, le mode d'action des GCs est essentiellement génomique (**Cavaillon, 2000**). Il se traduit par l'inhibition de la synthèse de nombreuses cytokines (TNF, IL1, IL2, INF...), chimiokines (IL8, MIP-1) molécules d'adhérences (ICAM, VCAM, selectine, intégrine), enzymes (protéases) et médiateurs lipidiques (PLA2, PGs), facteurs de croissance et de différenciations ainsi que l'induction de cytokines et de molécules anti-inflammatoires (Annexine-1, IL6, TGF β ...) (**Faure, 2009**).



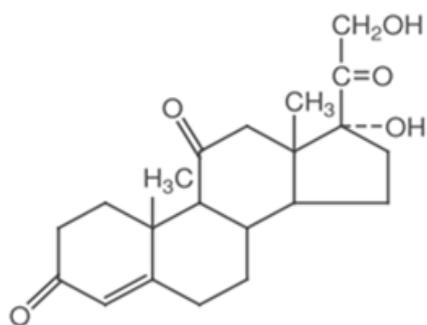
Dexamethasone (DECADRON®)



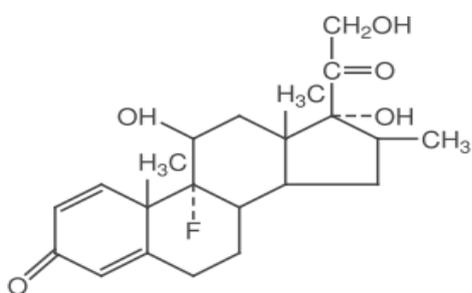
Prednisone (CORTANCYL®)



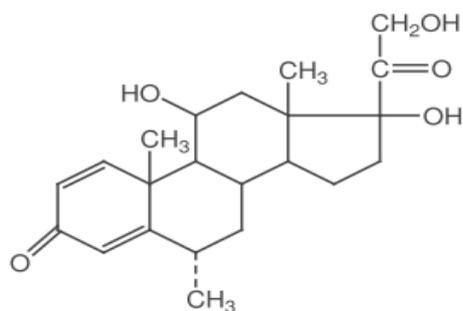
Hydrocortisone (naturel)



Cortisone (naturel)



Bethamethasone (CELESTENE®)



Methylprednisolone (MEDROL®)

Figure 8 : Structure des GCs naturels et de synthèses.

II-3-Les anti-inflammatoires non stéroïdiens :

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), forment un groupe hétérogène de substances qui réduisent ou suppriment les conséquences de la réaction inflammatoire, quel que soit son étiologie. Ce sont des médicaments aux propriétés, anti-inflammatoires, antipyrétiques et analgésiques (**Crauzille et Siebert, 2010**), qui regroupent plusieurs familles chimiques. Ils ont en commun l'inhibition de la synthèse des médiateurs lipidiques responsables d'effets délétères (**Derrier et Mercatello, 1997**). Les AINS ne se distribuent pas uniformément dans l'organisme, mais privilégient leurs tissus cibles, foyer inflammatoire et système nerveux central notamment (**Bannwarth et Berenbaum, 1999**).

A la lumière des connaissances actuelles, il paraît de plus en plus évident que la prise d'AINS entraîne une inhibition marquée de la réponse inflammatoire précoce, qu'elle peut altérer la cicatrisation naturelle d'une lésion et avoir un impact négatif sur le processus de réparation ultérieur (**Miossec, 2003**).

II-3-1-Mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens :

Les AINS dits « classiques » inhibent les deux iso enzymes : la COX1, constitutionnelle, et la COX2, inductible (figure 9). Le rapport d'inhibition COX1/COX2 détermine la probabilité d'effets indésirables. L'aspirine et l'indométacine, qui ont un rapport d'inhibition COX1/COX2 élevé, exposent à plus d'effets indésirables que l'ibuprofène, dont le rapport d'inhibition COX1/COX2 est bas (**Chioloero, 2000**). On distingue trois types d'inhibition de la COX :

- inhibition rapide, réversible, compétitive : elle survient quand un analogue du substrat, ayant une constante d'affinité similaire à celle de l'acide arachidonique, se lie à l'enzyme. la réaction ne donne aucun produit, l'enzyme n'est inactivée que pendant le temps où elle est en contact avec l'inhibiteur. la dilution ou la réversion compétitive de l'inhibiteur permettra de nouveau la synthèse de PG .
- inhibition irréversible, temps-dépendante: l'aspirine forme un dérivé acétylé covalent de l'enzyme, entraînant l'inactivation irréversible de la COX. Une fois l'enzyme inactivée, l'élimination de l'aspirine ne permettra pas la synthèse de PG, jusqu'à ce que la COX soit de nouveau synthétisé d'autres AINS comme l'indométacine, l'acide méfénamique, le flurbiprofène, inhibent la COX de façon

temps-dépendantes, mais ils diminuent son activité sans la supprimer complètement (**Brandstatter et al ; 2010**).

- inhibition réversible, non compétitive : la présence de radicaux libres dans les tissus lésés et inflammatoires stimule la synthèse de PG ; l'administration de piègeurs de radicaux libres ou d'antioxydants va diminuer la synthèse de PG (**Derrier et Mercatello, 1997**).

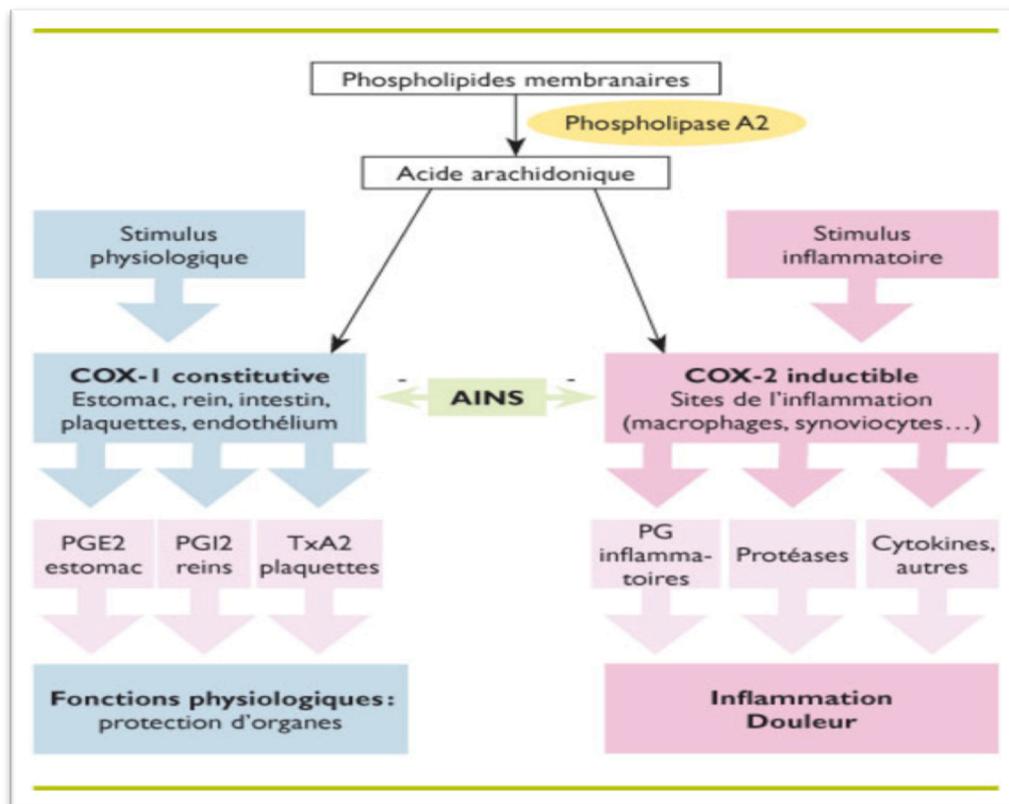


Figure 9 : Mécanisme d'action et effets des anti-inflammatoires non stéroïdiens (**Brandstatter et al., 2010**).

Jusqu'à présent, la totalité des anti-inflammatoires inhibaient simultanément les deux iso-enzymes, provoquant d'un côté une diminution de l'inflammation, mais de l'autre des répercussions parfois lourdes de conséquences. Le grand mérite d'une nouvelle classe de molécules récemment développée est qu'elle n'inhibe que la COX2, responsable de l'inflammation : il s'agit du célécoxib et du rofécoxib. Ces molécules sont qualifiées d'AINS inhibiteur sélectif de la COX 2 ou encore coxibs comme le montre la figure 10, l'iso-forme COX-1 reste accessible à l'acide arachidonique (**Muster, 2005**).

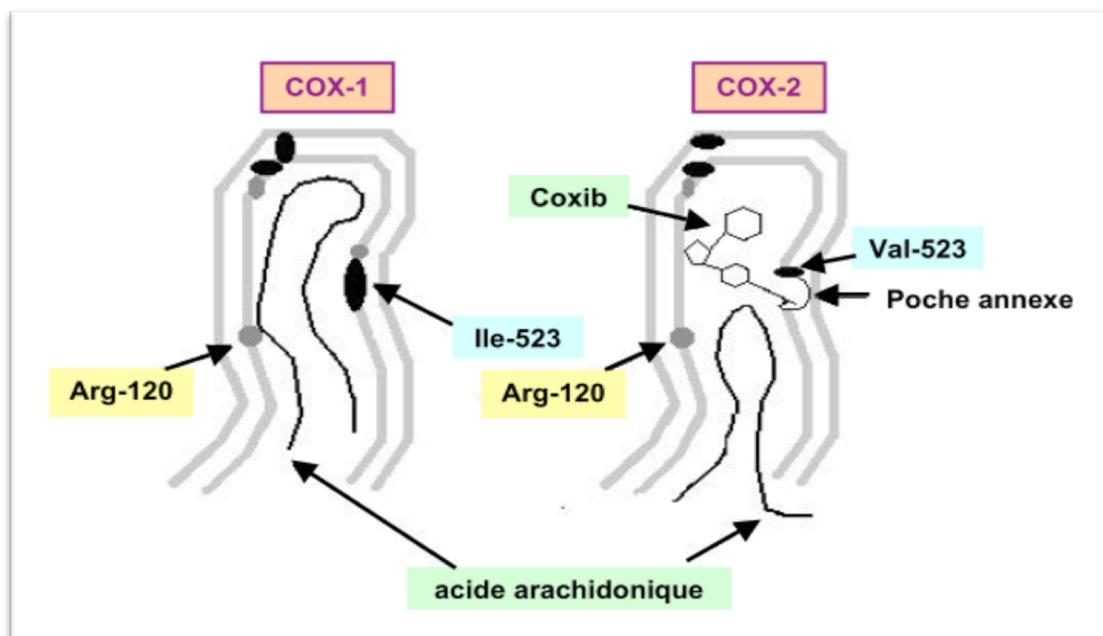


Figure 10 : Représentation schématique de l'inhibition sélective des coxibs (Hawkey, 1999).

II-3-2-Classification des AINS :

Les critères de classification des AINS sont variés, le tableau III montre quelques AINS classés selon la famille chimique, et leurs demi vie.

Tableau III : Classification des AINS (Ziltener et al., 2010).

Molécule	Famille	Demi vie	Mode d'action
A.acétylsalicylique	Salicylés	25-33mn	Inhibition irréversible des COX (par acétylation)
Ibuprofène	Arylcarboxyliques	1-2,5h	Inhibition réversible, compétitive des COX
flubirprofène	Arylcarboxyliques	4-6h	Inhibition réversible, compétitive des COX
Diclofénac	Arylcarboxyliques	1-2h	Inhibition réversible, non compétitive des COX et LOX
A.méfénamique	Fénamacs	2-4h	Inhibition réversible, compétitive des COX
Indométacine	Indoliques	4-5h	Inhibition réversible, non compétitive des COX et LOX
célécoxib	coxibs	—	Inhibition réversible, sélective de COX2
rofécoxib	coxibs	—	Inhibition réversible, sélective de COX2

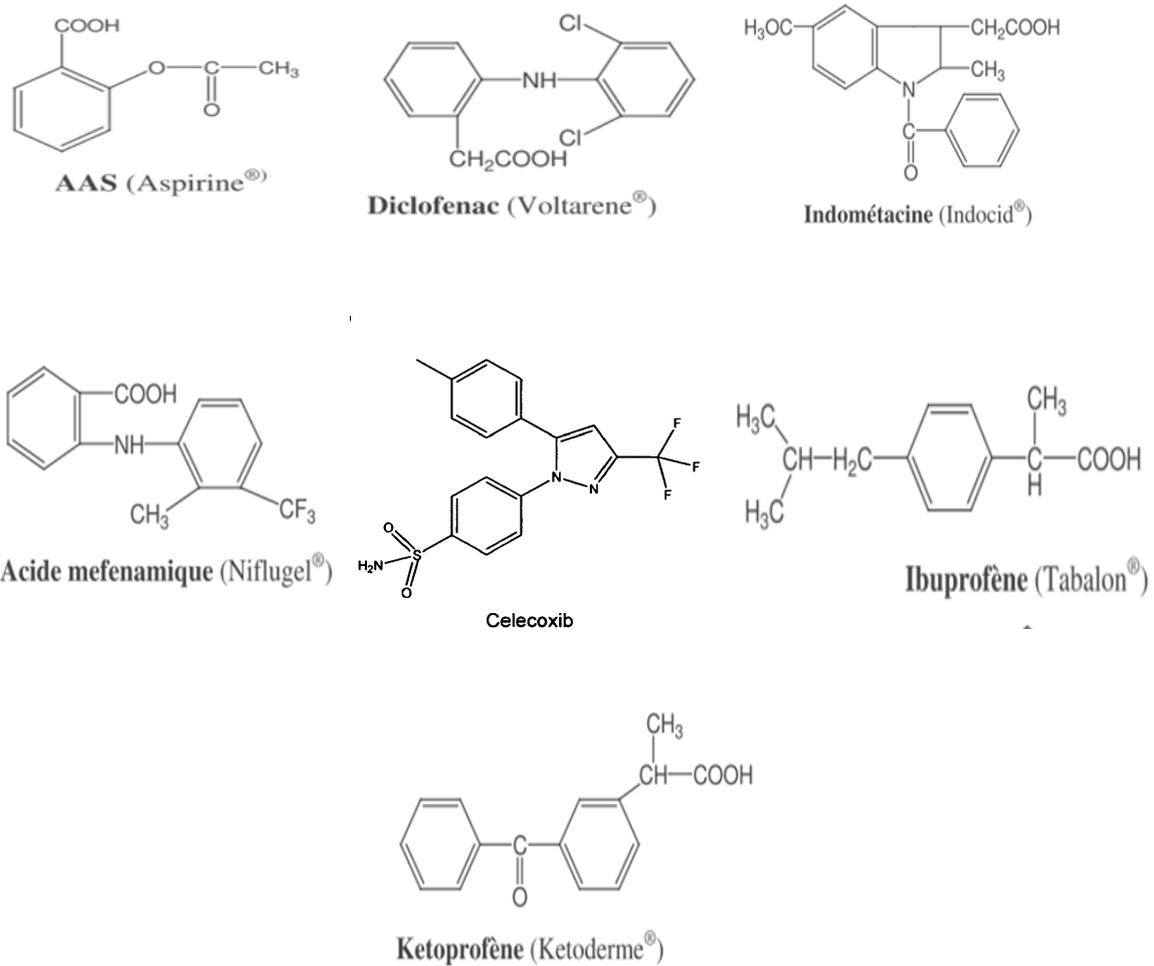


Figure 11: Structure de quelques AINS.

II-3-3-Exemple de mode d'action du diclofénac :

Il possède un effet antalgique direct et un effet anti-inflammatoire sur la phase initiale et la phase tardive de l'inflammation. Ce médicament est utilisé dans le traitement de l'arthrose, des rhumatismes inflammatoires, dans le traitement des rhumatismes extra-articulaires.

Le diclofénac est un puissant AINS, il bloque de façon réversible et non spécifique l'activité de la cyclo-oxygénase 1 et 2, empêchant ainsi la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines ainsi que la production de thromboxanes et de radicaux libres d'oxygène (figure 12). De plus, le diclofénac bloque la voie de la lipoxygénase, inhibant ainsi la formation de leucotriènes B₄ (LTB₄). Les LTB₄ sont des médiateurs de la douleur connus pour stimuler les nocirécepteurs au niveau des nerfs périphériques (**Roux, 1990**).

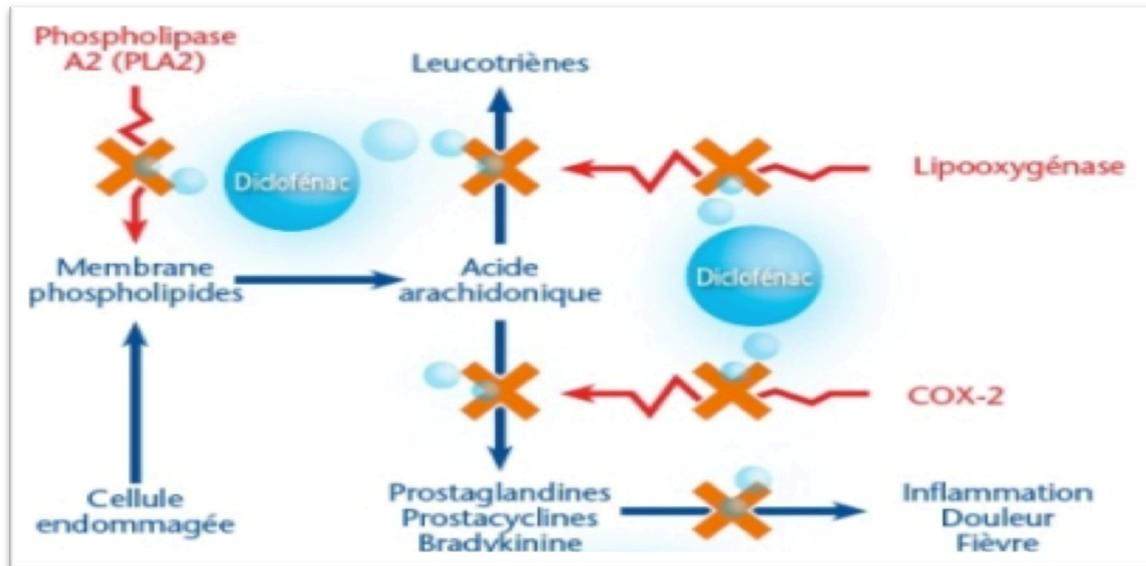


Figure 12 : Cible moléculaire du diclofénac.

II-4-Anti-inflammatoire d'origine végétale :

II-4-1-Les polyphénols :

Historiquement, les composés produits par les plantes ont été séparés en métabolites primaires et secondaires. Par définition, les métabolites primaires sont des molécules présentes dans toutes les cellules végétales et nécessaires à la vie de la plante. Les sucres simples, les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques sont des exemples de métabolites primaires.

D'autre part, les métabolites secondaires ont une répartition limitée, dans la plante elle-même comme parmi les différentes espèces de végétaux. Ils ont d'abord été considérés comme des produits rebut, mais on sait maintenant que les métabolites secondaires sont d'importantes molécules servant à la communication, la survie et la propagation des plantes qui les produisent.

Beaucoup fonctionnent comme signaux chimiques permettant à la plante de répondre aux contraintes de l'environnement. D'autres interviennent pour défendre leur producteur contre les herbivores, les pathogènes, ou même les compétiteurs. Certains assurent une protection contre les radiations solaires et d'autres encore facilitent la dispersion du pollen et des graines.

Comme on l'a signalé, les métabolites secondaires ne sont pas également repartis au sein de la plante. Ils sont produits par des tissus et/ou des types cellulaires spécifiques, à des stades particuliers du développement. Les métabolites secondaires sont produits à différents niveaux de la cellule, et emmagasinés surtout dans les vacuoles.

Les trois classes principales de composés secondaires chez les végétaux sont les alcaloïdes, les terpénoïdes et enfin les composés phénoliques (**Raven et al., 2008**).

Les composés phénoliques englobent une vaste gamme de molécules possédant tous un ou plusieurs groupement hydroxyle (-OH) attachés à un cycle aromatique (noyau benzénique) (**Wichtl et Anton, 2003**). Ils sont présents dans presque toutes les plantes, et s'accumulent dans toutes les parties de l'organisme : feuilles, tiges, écorce, racines, fleurs, fruits et embryons (**Brzozowska et Hanower, 1976**). En effet, il est bien connu que dans la cellule végétale, les polyphénols sont synthétisés, du moins pour la plupart, au niveau des chloroplastes, certains même participeraient à l'élaboration de la photosynthèse. Ces composés subiraient plusieurs réactions chimiques (estérification, éthérisation, glycosidation etc...) au niveau du cytoplasme et seraient stockés principalement dans les vacuoles et les parois cellulaires, (**Chebil et al., 2006**). Les composés phénoliques (phénols simple, et flavonoïdes) forment le groupe de composés phytochimiques le plus important des plantes (figure 13) (**Beta et al., 2005**). Bien qu'ils soient le groupe le plus étudié des métabolites secondaires, la fonction de beaucoup de produits phénoliques reste encore inconnue (**Han et al., 2007**).

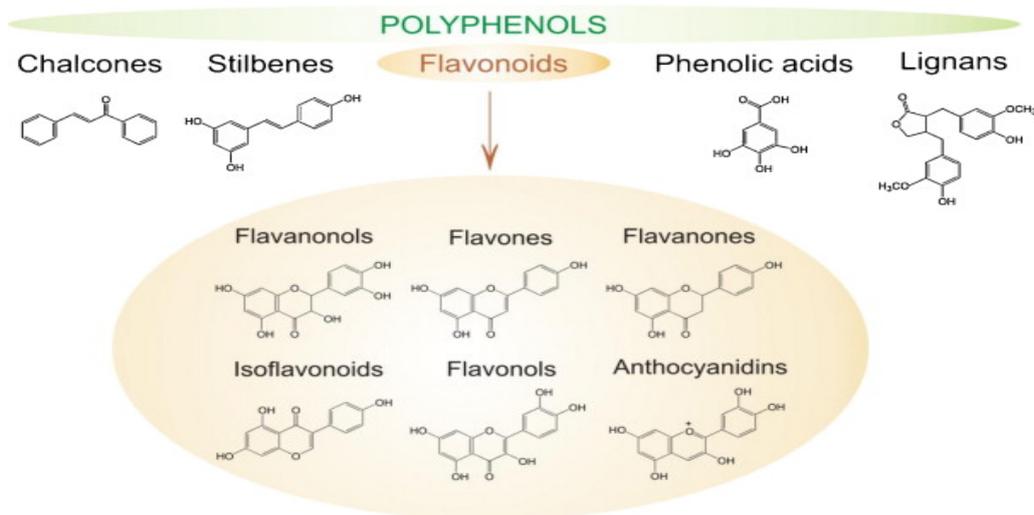


Figure 13 : Classification et structure des polyphénols (Stevenson et Hurst., 2007).

D'après (**Brunton, 2009**), qui a divisé les polyphénols en 5 classes, en prenant compte de leurs structures générales (nombre de noyau benzène), le nombre des doubles liaisons ainsi que les additions fonctionnelles.

De nos jours les plantes médicinales sont très utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde pour le soulagement de nombreuses pathologies à caractère inflammatoire tel que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, la bronchite, l'athérosclérose, l'arthrose, la goutte (**Setty et Sigal, 2005 ; Wiart, 2006**).

Le tableau IV montre quelques plantes médicinales traditionnelles et leurs usages en phytothérapie.

Tableau IV : Différentes plantes médicinales et leurs composées phénoliques

La plante	Composées phénoliques	L'extrait de la plante	Effets thérapeutique	La référence
<i>Cayaponia tayuya</i>	Flavonoïde	Extrait méthanolique	Anti-inflammatoire analgésique, diurétique	(Aquila et al., 2009)
<i>Papaver rhoeas</i>	Flavonoïde	Extrait éthanolique	Anti-inflammatoire	(Soulimani et al., 2001)
<i>Clerodendrum petasites S.</i>	Flavonoïde	Extrait éthanolique	Anti-inflammatoire, anti- pyrétique	(Panthong et al., 2003)
<i>Bauhinia racemosa</i>	flavonoïdes, tannins coumarines, stilbènes	Extrait méthanolique	anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique	(Gupta et al., 2005)

L'activité anti-inflammatoire de ces plantes revient à leur contenu en métabolites secondaires dotés d'activités biologiques qui sont : les polyphénols, les saponines, les coumarines, et les polysaccharides...

II-4-2- Les polyphénols et l'inflammation :

Les propriétés anti-oxydantes des polyphénols ont longtemps été considérées comme étant la principale activité expliquant leurs effets bénéfiques sur l'organisme. Cependant, de nombreuses investigations ont pu mettre en évidence plusieurs activités pharmacologiques, leur conférant d'énormes potentiels thérapeutiques ; en outre les polyphénols son dotés d'activités anticancéreuses, antivirales, antifongiques, anti-apoptotique, neuroprotectrices,

hépatoprotectrices, gastroprotectrices, antitoxiques et anti-inflammatoires (**Salas-Salvado et al., 2008**).

Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'effet anti-inflammatoire d'un grand nombre de ces plantes ainsi que le mécanisme d'action de plusieurs d'entre elles. Les substances actives des plantes peuvent agir à plusieurs niveaux de la réaction inflammatoire en inhibant le métabolisme de l'acide arachidonique, les mécanismes de transduction du signal impliqués dans l'activation des cellules inflammatoires, la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et l'expression des molécules d'adhésion (**Duwiejua et Zeitlin, 1993**).

D'autres expérimentations ont permis de montrer que les polyphénols pouvaient réguler les activités enzymatiques du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) : phospholipase A2, cyclooxygénase et lipoxygénase. L'inhibition de ces enzymes par les polyphénols réduirait ainsi la production de prostaglandines et de leucotriènes, médiateurs de l'inflammation (**Kim et al, 2004; Guo et al, 2009; Larrosa et al., 2009**). D'autres essais ont pu mettre en évidence la corrélation entre les voies transductionnelles empruntées pendant l'inflammation et l'action des polyphénols, en effet les polyphénols agiraient en modulant l'expression de plusieurs gènes, ainsi l'activité anti-inflammatoire de ces métabolites serait reliée à l'inhibition de facteurs de transcription clés des voies inflammatoires telles que NF- κ B et AP-1 (**Santangelo et al., 2007**).

II-4-2-1-Propriétés anti-inflammatoire des flavonoïdes :

Les flavonoïdes représentent la plus grande classe des polyphénols, il en va de soit que ces derniers seraient les plus étudiés. Effectivement, les données concernant les flavonoïdes ne cessent davantage de croître à travers le monde (**Bonghi et al., 2012**).

L'activité anti-inflammatoire des flavonoïdes et des polyphénols est résumée en image montrant différentes cibles de ces composés. Au niveau de la cellule les flavonoïdes comme la curcumine, le resveratrole (sous classe stilbène) ou la théophylline seraient capables de moduler l'expression de plusieurs médiateurs pro-inflammatoire, et ce par inhibition du facteur de transcription NF- κ B ou en agissant directement au niveau des gènes (**Tapiero et al., 2002**).

De plus, l'effet antioxydant des flavonoïdes et des polyphénols permettrait aussi d'apprécier un effet anti-inflammatoire, en effet le stress oxydatif induit plusieurs voies transductionnelles, dont la conséquence est l'activation du NF- κ B (figure 14), dès lors la suppression de l'une de ces voies entrainerait la répression des gènes pro-inflammatoires (Tapiero *et al.*, 2002).

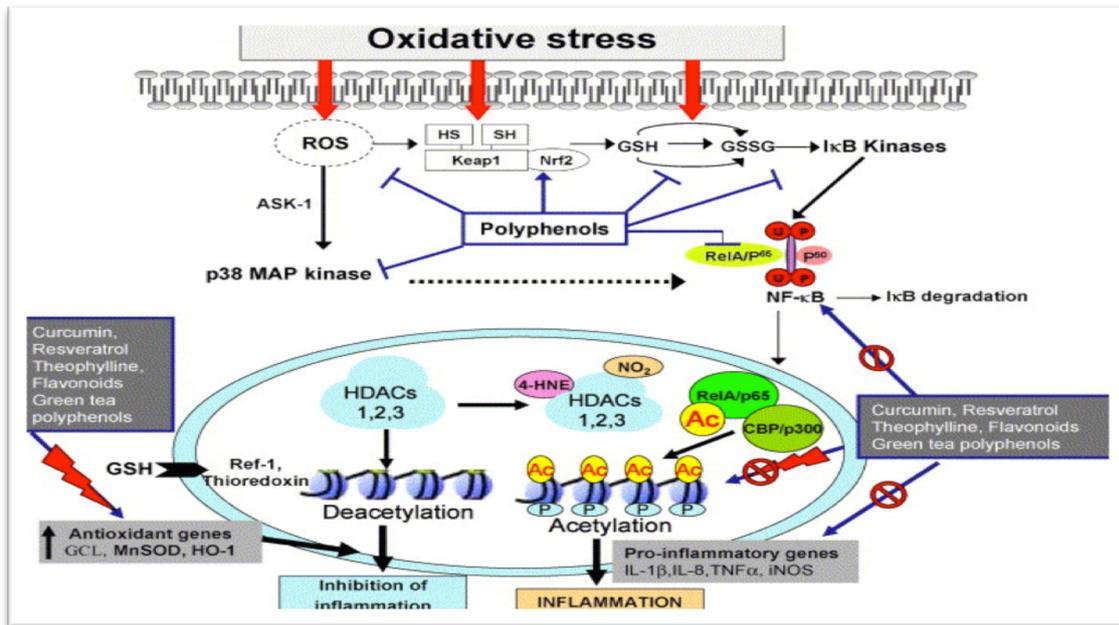


Figure 14: Les différentes cibles des flavonoïdes et des polyphénols sur la réaction inflammatoire (Tapiero *et al.*, 2002).

D'autres études *in vitro* et *in vivo* ont permis de cribler l'effet anti-inflammatoire de plusieurs molécules comme la quercétine, le kaempférol la génistéine (inhibition de TNF α et IL1 β) et l'apigénine (inhibition de l'IL8) (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2004).

II-4-2-2-Relation entre la structure et la fonction des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des composés à la structure C6-C3-C6, comportant 3 noyaux benzéniques respectivement de gauche à droite A C B comme le montre la figure 14. Le noyau C peut être à l'état ouvert, recyclé, saturé ou insaturé (critères de classification). Chaque carbone de ces composés est capable de s'engager dans une liaison avec un résidu (glutathion, glycoside). Dans cet ordre, plusieurs dérivés de ces polyphénols peuvent être formés, ce qui pourrait influencer sur l'inflammation de manières différentes (Ghedira, 2007).

Plusieurs travaux ont été réalisés sur des modèles de l'inflammation *in vivo* et *in vitro* et ont tentés d'apporter leur contribution concernant la question.

Suite à une étude comparative réalisée *in vitro* sur 39 flavonoïdes et composés apparentés, l'évaluation de l'effet inhibiteur de ces derniers sur la production de prostaglandines, a pu attribuer le plus fort taux d'inhibition sur l'expression de la COX-2 aux flavonoïdes. Il y aurait à priori une différence notable du pouvoir inhibiteur, au sein même de la classe des flavonoïdes ; en effet les flavones (figure 15/a) seraient les plus efficaces, suivies de près par flavonoles (figure 15/b) et en dernier les flavanones (figure 15/c). Ces résultats suggèrent que la double liaison en position C2-C3 ainsi que le groupement fonctionnel 4-oxo du noyau C (cercle rouge), joueraient en faveur du fort potentiel anti-inflammatoire de cette classe (Takano-Ishikawa, 2006).

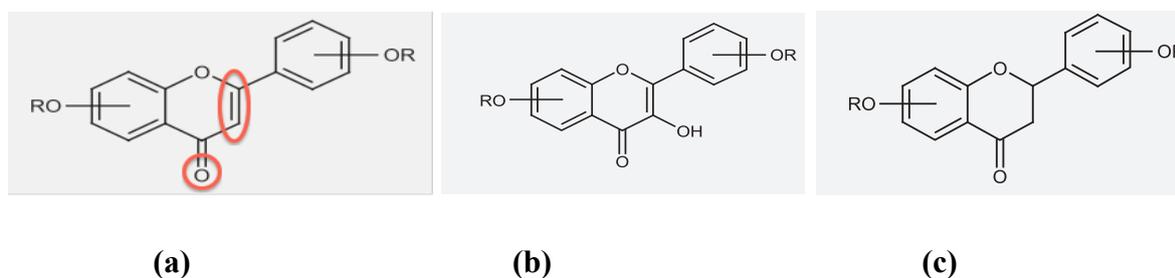


Figure 15 : Structure générale de trois sous classe de flavonoides : (a) flavones ; (b) flavanone ;(c) flavonol.

Odontuya. (2005) quant à lui, a démontré que la lutéoline inhibait à la fois la COX et la LOX, alors que ces dérivés glycolysés présenteraient une certaine sélectivité pour l'une ou l'autre des enzymes du métabolisme de l'AA. La présence du groupement ortho-dihydroxy sur le cycle B et le groupement hydroxyl (en position C5) du cycle A pourrait contribuer de manière significative aux activités anti-inflammatoires et anti-oxydantes de ces composés. Par contre, il a été démontré que l'addition de groupements glycosidiques sur des flavonoles comme la quercétine et la rutine n'altérerait en rien l'activité anti-inflammatoire de ces derniers après injection de la CGN (Morikawa, 2003).

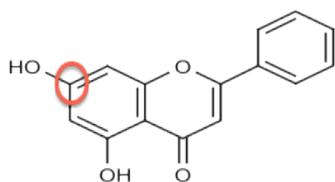
D'autres études *in vitro*, ont démontré que la COX-2 est sélectivement inhibée par la chrysin 5,7-diacetylflavone (Ch-4), un dérivé de la chrysin (flavone). La modélisation tridimensionnelle a montré que l'effet du Ch-4 serait dû à une liaison hydrogène entre

l'oxygène de son groupement cétonique (en position 7) et le groupement hydroxyle du résidu Tyr 355 de la COX-2. De plus le Ch-4 n'a exhibé aucun effet sur l'activité de la iNOS contrairement à son homologue Ch-2 (chrysine 5-hydroxy-7-methoxyflavone (**Cho et al., 2004**)).

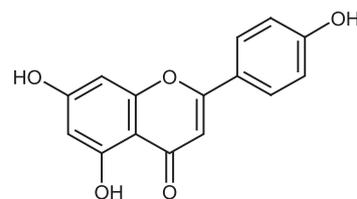
Selon **Funakoshi-Tago. (2011)**, l'activité anti-inflammatoire de l'apigénine, la lutéoline et la fisetin (flavonoïdes aux structures apparentées) serait due à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF-kB, et ce sans avoir d'incidence sur son inhibiteur ou sur sa liaison à l'ADN. Le fait intéressant de cette étude, réalisée *in vitro*, est que l'activité suppressive de ces molécules serait due à la répression du gène codant l'une des sous unités (p65) du facteur NF-kB. Cet effet pourrait être dû à l'empreint de différentes voies de signalisation par ces flavonoïdes. De plus, l'administration de l'apigénine et de la lutéoline a nettement inhibée l'œdème de la patte induit par la carragénine chez la souris, contrairement à l'administration de la fisetin, qui n'a noté aucun effet (**Funakoshi-Tago, 2011**).

Ces observations suggèrent fortement que de légères différences au niveau des structures de ces composés pouvaient avoir plusieurs incidences (positive ou négative) sur la réponse inflammatoire.

La figure 16 représente quelques structures et activités de flavonoïdes énoncés précédemment, les carbones ou les fonctions encerclés représentent leurs implication présumé dans l'activité anti-inflammatoire.

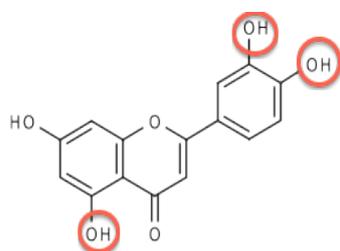
**Chrysin**

(5,7-Dihydroxyflavone)

Inhibition de COX-2, inhibiteurs de
NF-kB**Apigénine**

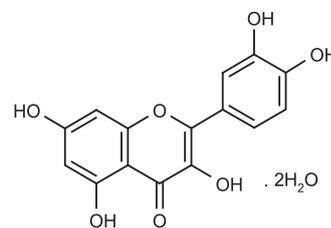
(4',5,7-Trihydroxyflavone)

Inhibition de l'expression de NF-kB,

**Lutéoline**

(3',4',5,7-Tetrahydroxyflavone)

-Inhibition de COX et LOX

**Quercétine**

(3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone)

Inhibition de TNF α , NO

Figure 16 : Structure de quelques flavonoides (Odontuya *et al.*, 2005 ; Funakoshi-Tago *et al.*, 2011 ; Cho *et al.*, 2004 ; Morikawa *et al.*, 2003).

Partie II

Etude expérimentale

Chapitre III :

Matériels et Méthodes

III-Matériels et méthodes :

Objectif : Cette présente étude a pour but d'évaluer *in vivo* l'activité anti-inflammatoire de l'extrait brut éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris* ainsi que la toxicité aigüe de cette plante médicinale.

III-1-Matériels :

III-1-1- Matériel animal et conditions d'élevage :

Afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire et la toxicité *in vivo* de l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris*, des souris NMRI albinos mâles et femelles, d'un poids variant entre (18-30g) ont été utilisées.

Ces animaux proviennent des centres d'élevage de l'institut Pasteur d'Alger et l'expérimentation a été réalisée au niveau de l'animalerie de l'université de Bejaia.

Après une adaptation de 2 semaines, les animaux ont été mis sous des conditions de température ambiante de (23-26°C) et d'humidité de (60-70%), afin de respecter leur cycle biologique. La salle des expériences a été soumise à un éclairage artificiel de 12 heures. Les souris ont été nourries à volonté avec l'aliment à bouchon et l'eau de robinet.

III-1-2-Matériel végétal :

La plante choisie pour cette étude est *Ulmus campestris*, il s'agit d'une plante médicinale Algérienne, retrouvée dans la région de Bejaïa appelée communément, orme champêtre ou oulmou. L'écorce a été choisie sur la base de son utilisation dans la médecine traditionnelle dans les soins des maladies à caractère inflammatoire.



Figure 17 : Image photographique de l'écorce de *Ulmus campestris* (Original).

Description : *Ulmus campestris* est un bel arbre à cime touffue pouvant atteindre 35m, que l'on peut trouver au bord des chemins dans les haies et dans les bois. Les feuilles sont velues, rudes au toucher, dentées, et asymétriques à la base. Les fleurs de cette plante sont rougeâtres ou verdâtres et le fruit est samare ailée.



Figure 18 : Image photographique de l'orme champêtre (**Original**).

Localisation : On trouve l'orme dans toute l'Europe (sauf dans les régions boréales), en Asie tempérée et en Afrique du nord.

Classification : L'identification de la plante a été réalisée au sein du laboratoire de botanique de l'université de Bejaia et représentée dans le tableau suivant :

Tableau V: Classification taxonomique de *Ulmus campestris*

Règne	plantae
Embranchement	spermatophytes (phanérogames)
Sousembanchement	Angiosperme
Classe	Dicotylédone
Ordre	urticales
Famille	Ulmaceae
Genre	<i>Ulmus</i>
Espèces	<i>Ulmus campestris</i>
Appellation locale	Oulmou ou n'chem

III-1-3-Matériels de laboratoire :

- Le pléthysmomètre (IITC, science life) est un appareil de mesure du volume de la patte. Il est composé d'une cellule de mesure en perspex contenant de l'eau distillée dans laquelle la patte de la souris est plongée (figure19).



Figure 19: Le pléthysmomètre.

- Balance électrique (KERN Almande) pour la pesée des souris.
- Micropipette

III-2-Méthodes :

III-2-1-Préparation de l'extrait :

- **Récolte** : L'écorce de *Ulmus campestris* a été récoltée et échantillonnée en septembre 2012. La récolte a eu lieu dans la forêt d'Azru n Bechar à Amizour située à l'est de Bejaia, dans un endroit naturel loin de tout contact avec la pollution, et ce pour écarter toute modification dans la composition chimique de l'espèce.
- **Séchage** : L'écorce de *Ulmus campestris* a été séchée à température ambiante dans un endroit ombragé, puis il s'en est suivi un séchage de 24h à l'étuve (37°C), afin d'éliminer toute trace d'humidité.
- **Broyage** : A l'aide d'un broyeur électrique, l'écorce de *Ulmus campestris* prédécoupée a été broyée afin d'obtenir une poudre fine.
- **Tamisage**: la poudre obtenue a été tamisée à l'aide d'un tamiseur avec différents diamètres, pour obtenir une poudre très fine de diamètre inférieur à 63 µm afin

d'optimiser l'extraction. La poudre a été stockée à l'abri de la lumière dans des flacons en verre fermés et à 4°C.

- **L'extraction :** La poudre obtenue a été macérée 24h avec de l'éthanol (1 :4 w/v), puis a été décantée pour une durée de 24h. Le surnageant a été récupéré dans des cristallisoirs, afin de subir une évaporation à température ambiante et dans un endroit ombragé jusqu'à stabilisation du poids sec.

III-2-2-Etude de l'activité anti-inflammatoire :

III-2-2-1-Le protocole :

L'étude expérimentale de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris* a été réalisée selon la méthode décrite par **Winter et al. (1962)**, avec quelques modifications, selon laquelle l'inflammation est induite par l'injection sous cutané dans la patte arrière gauche de la souris, d'une solution de λ -carragénine (CGN) à 1 % fraîchement préparée dans de l'eau physiologique (à 0,9 %) à la dose de 0,05 ml/patte de souris (**Panthong et al, 2003**).

Les animaux utilisés ont été privés de nourriture pendant les 18 heures précédant l'expérience et privés d'eau pendant la période expérimentale. Un effectif de 30 souris a été réparti en 5 lots (6 souris par lot).



Figure 20 : Lot des souris en cage.

Les traitements de chaque lot sont effectués par gavage à l'aide d'une sonde gastrique (10ml/kg) (figure 21/b) une heure avant l'injection de la solution de la CGN (figure 21/a).

- **Le lot contrôle négatif** : Les souris de ce lot reçoivent la solution véhicule (eau physiologique) de NaCl (0,9%)
- **Le lot contrôle positif** : Ces souris reçoivent un anti-inflammatoire de référence, qui est le diclofénac sodique (D.c) à une concentration de 50 mg/Kg. Il est dissout dans une solution de de NaCl (à 0,9%)
- **Les lots essais** : Reçoivent l'extrait éthanolique à tester à raison de 100, 200 et 400 mg/Kg dissous dans du NaCl (à 0,9%).



(a)



(b)

Figure 21 : Injection de la CGN (a) et administration orale des solutions (b).

III-2-2-2-Evaluation de l'activité anti-inflammatoire :

La mesure des volumes en (ml) de la patte arrière gauche de chaque souris a été effectuée avant l'induction de l'œdème et à chaque heure durant une période de 6 h après l'injection de la CGN. Le volume de la patte a été mesuré par immersion dans l'eau distillée contenu dans la cellule du pléthysmomètre (figure 22/a). L'immersion de la patte provoque le déplacement d'un volume d'eau qui correspond au volume de celle-ci. Ce volume est traduit et enregistré grâce à la partie électronique du pléthysmomètre (figure 22/b) (Zhu *et al*, 2011).

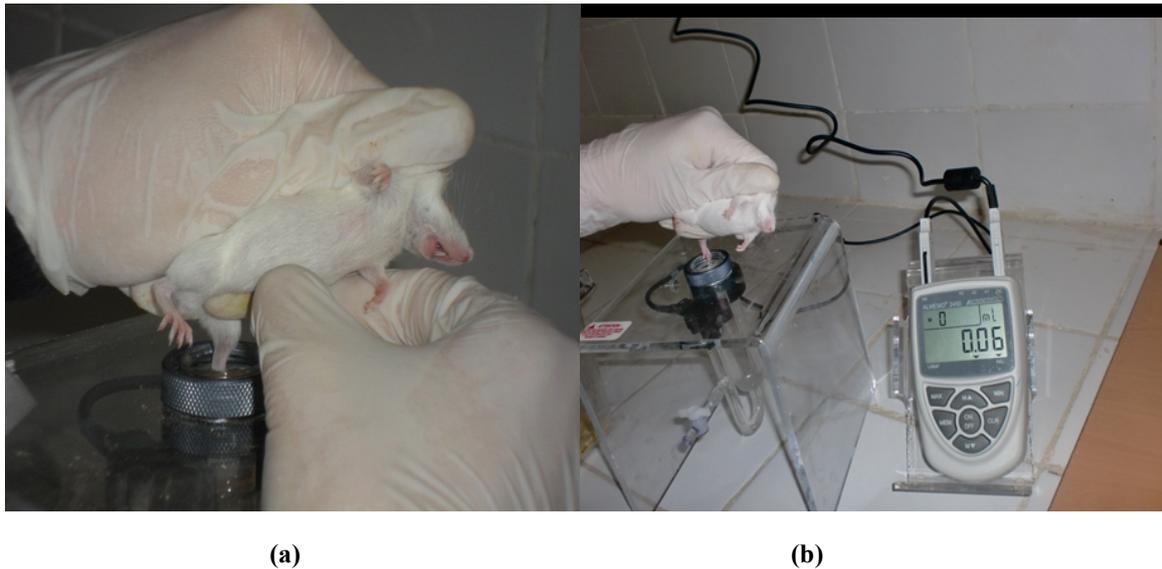


Figure 22 : Mesure de volume de la patte de souris par le pléthysmomètre. (a) immersion, (b) volume enregistré.

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par la détermination du pourcentage d'inhibition de l'œdème en présence de l'extrait relatif au contrôle selon la formule suivante :

$$\% \text{d'inhibition} = [(V_n - V_o) \text{ contrôle} - (V_n - V_o) \text{ traité}] / (V_n - V_o) \text{ contrôle} \times 100$$

Le pourcentage d'augmentation d'œdème est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'augmentation d'œdème} = [(V_n - V_o) / V_o] \times 100$$

(V_o : volume moyen mesuré avant l'injection de la carragénine).

(V_n : volume moyen mesuré aux heures de relevé $n=1$ à $n=6$ heures après l'injection de la carragénine (Ndiaye *et al.*, 2006).

III-2-3-Étude de la toxicité aiguë :

La toxicité aiguë de l'extrait éthanolique d'écorce de *Ulmus campestris* a été testée chez les souris NMRI albinos mâles et femelles réparties aléatoirement afin d'évaluer son innocuité.

Sept lots de 6 souris mâles et femelles (18-30 g) ont été privés de nourriture pour les 18h précédant l'administration de l'extrait. Les souris ont été réparties de la façon la plus homogène possible, et ont reçu par voie orale des doses allant de 0,1 à 3 g/kg de l'extrait de l'écorce de *Ulmus campestris*, les 7 lots reçoivent des quantités égales d'eau et de nourritures.

Des observations sont faites pendant 96 heures, Pour toutes mortalités et tous changements comportementaux comme l'hyperactivité, les convulsions, l'asthénie, la salivation, l'agitation, l'appétit, la soif et la mortalité, et ceci comparativement à un lot témoin. Les quatre premières heures sont soumises à une surveillance intensive.

III-2-4-Etude statistique :

Les données sont présentées comme moyenne \pm SEM. Les analyses ont été faites grâce au logiciel ANOVA, suivant le test de Dunnett's, utilisé afin de comparer les valeurs des groupes traités aux valeurs du groupe contrôle, avec des significations statistiques de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns (non significatif), utilisant un effectif de $n=6$.

Chapitre IV :

Résultats et Discussion

IV-1- Activité anti-inflammatoire :

L'inflammation est un processus physiologique impliqué dans un grand nombre de maladies aiguës et chroniques. Cependant, le recours aux anti-inflammatoires de synthèse reste insatisfaisante, contraignante, onéreuse et entraîne beaucoup d'effets indésirables (ulcères gastriques, actions immunosuppressives, intolérances, accidents cardiovasculaires...) (Fricker et al., 2011). D'où la nécessité de la recherche de nouveaux principes actifs d'origine végétale, qui pourraient agir directement sur les médiateurs de l'inflammation, et qui auraient une meilleure disponibilité.

Ce travail s'inscrit dans ce cadre et consiste à évaluer l'activité pharmacologique (anti-inflammatoire) de substances extraites à partir de l'écorce de *Ulmus campestris*. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire est réalisée par le test d'induction d'une inflammation aiguë par la carragénine (CGN). Cet agent phlogogène induit au niveau de la patte de souris un œdème considéré comme un signe caractéristique de l'inflammation et qui est un paramètre très important dans l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de plusieurs composés (Riahi et al., 2011).

Cette technique a été sélectionnée en raison de sa simplicité d'exécution, de sa rapidité d'induction des symptômes caractéristiques de l'inflammation (développement de l'œdème) et également en raison de sa reproductibilité.

L'étude de l'activité anti-inflammatoire a été testée sur cinq lots de souris (témoin, extraits et référence). Elle est basée sur l'injection de 0,05ml de carragénine à 1 %, au niveau de la patte postérieure gauche de la souris, provoquant ainsi une inflammation visible dès la première heure (figure 23/b), le volume de l'œdème augmente en fonction du temps jusqu'à atteindre son niveau maximum à la troisième heure (figure 23/b) (Zhu et al., 2011).

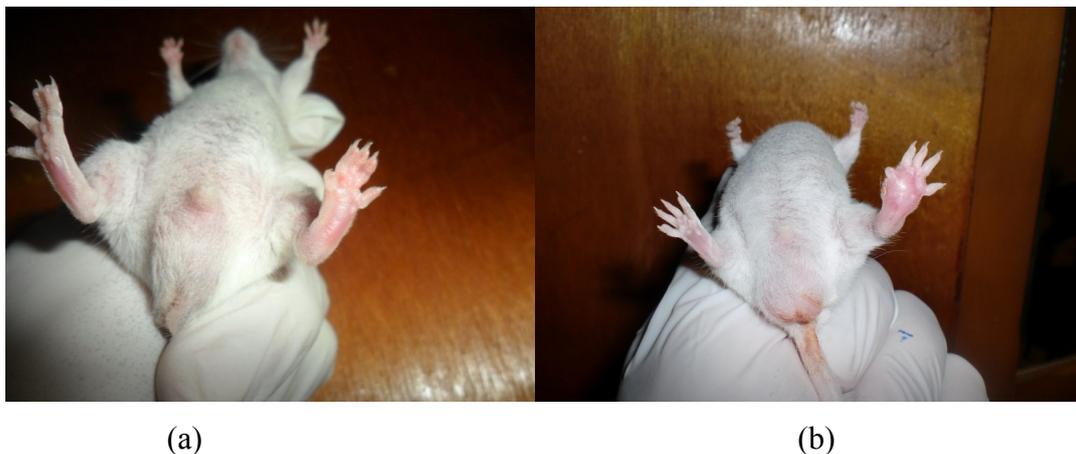


Figure 23 : Image de l'œdème de la patte induit par la carragénine à 1h (a) et à 3h (b).

Dès sa pénétration dans l'organisme, la CGN est rapidement détectée par les cellules immunitaires résidentes dans les tissus : macrophages, mastocytes. La reconnaissance de ce corps étranger s'effectue via le récepteur NOD 2. L'activation du récepteur déclenche une voie transductionnelle distincte, aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Ce dernier étant un déterminant clé de la cascade inflammatoire et occupe un rôle central dans l'activation transcriptionnelle des gènes pro-inflammatoires (IL8, TNF α , IL1 β , histamine...) (**Borthakur et al., 2007**). D'autres études ont démontré que la CGN induisait aussi l'inflammation par la synthèse des iNOS et de l'IL8 (**Liao et al., 2012**).

Le développement œdémateux induit par la CGN sur les différents groupes testés a été observé et mesuré. Les différents résultats obtenus sont représentés dans les tableaux VI et VII mettant en valeur l'évolution des moyennes du volume des patte en fonction du temps et les % d'augmentation d'œdème. Les différents ΔV ont été représentés dans la figure 24.

Tableau VI : Tableau des volumes des pattes

	V0 \pm SEM	V1 \pm SEM	V2 \pm SEM	V3 \pm SEM	V4 \pm SEM	V5 \pm SEM	V6 \pm SEM
Control -	0,125 \pm 0,008	0,198 \pm 0,007	0,238 \pm 0,007	0,273 \pm 0,011	0,268 \pm 0,010	0,266 \pm 0,010	0,263 \pm 0,011
D.c	0,150 \pm 0,005	0,188 \pm 0,006	0,218 \pm 0,006	0,271 \pm 0,007	0,225 \pm 0,006	0,198 \pm 0,010	0,180 \pm 0,006
U.C 100	0,143 \pm 0,008	0,200 \pm 0,008	0,235 \pm 0,006	0,281 \pm 0,004	0,250 \pm 0,007	0,233 \pm 0,008	0,216 \pm 0,008
U.C 200	0,146 \pm 0,006	0,211 \pm 0,005	0,288 \pm 0,006	0,285 \pm 0,003	0,250 \pm 0,009	0,230 \pm 0,005	0,218 \pm 0,004
U.C 400	0,143 \pm 0,005	0,200 \pm 0,005	0,235 \pm 0,003	0,281 \pm 0,005	0,250 \pm 0,010	0,233 \pm 0,009	0,216 \pm 0,006

Contrôle -: témoin traité avec le sérum physiologique; D.c: groupe traité avec le diclofénac; Ulmus 100, 200, 400: groupes traités avec l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* à 100, 200 et 400mg/kg. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM pour n = 6.

Tableau VII : Tableau des pourcentage d'augmentation d'œdème en fonction du temps

	1h	2h	3h	4h	5h	6h
Contrôle (-)	58,66 \pm 5,33%	90,66 \pm 3,95%	118,66 \pm 5,23%	114,66 \pm 8,17%	113,33 \pm 7,27%	110,66 \pm 5,62%
D.c	25,55 \pm 2,67%	45,55 \pm 4,82%	81,11 \pm 4,68%	50 \pm 3,75%	32,22 \pm 4,99%	20 \pm 3,84%
U.C 100	39,53 \pm 6,15%	63,95 \pm 6,08%	96,51 \pm 4,19%	74,41 \pm 8,88%	62,79 \pm 5,09%	51,16 \pm 5,88%
U.C200	44,31 \pm 4,9%	96,59 \pm 3,8%	94,88 \pm 5,01%	70,45 \pm 7,18%	56,81 \pm 6,26%	48,86 \pm 6,44%
U.C400	37,34 \pm 2,22%	63,25 \pm 3,19%	95,78 \pm 3,15%	67,46 \pm 2,76%	57,83 \pm 7,69%	49,39 \pm 3,14%

Contrôle(-): témoin traité avec le sérum physiologique; D.c: groupe traité avec le diclofénac; U.C 100, 200, 400: groupes traités avec l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* à 100, 200 et 400mg/kg. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM pour n = 6.

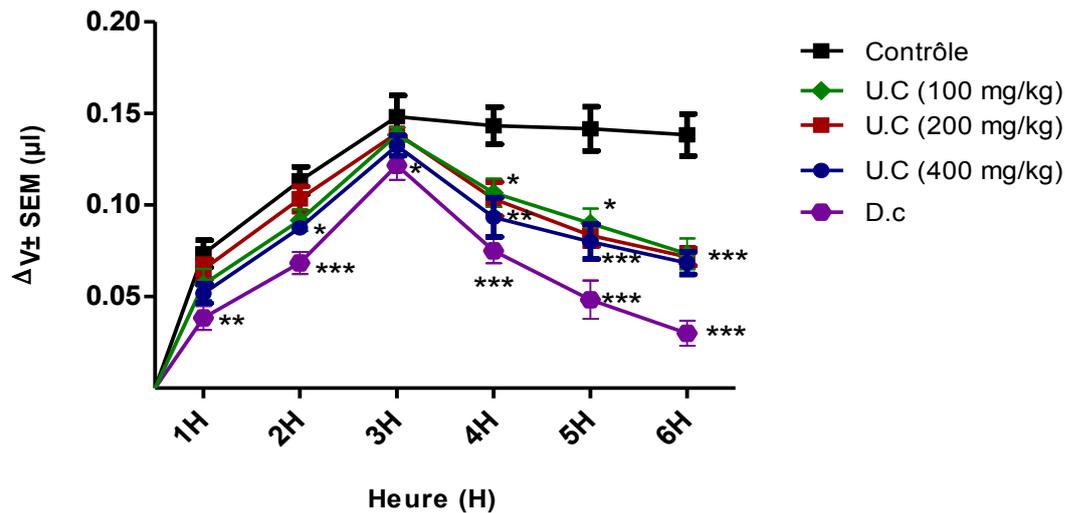


Figure 24 : Courbe de l'évolution de l'œdème inflammatoire en fonction du temps.

Contrôle: témoin traité avec le sérum physiologique; D.c: groupe traité avec le diclofénac; U.C 100, 200, 400: groupe traité avec l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* à 100, 200 et 400mg/kg. Les résultats sont présentés en moyenne \pm SEM pour $n = 6$. avec $p^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$ et $p^{***} < 0.001$ indiquent une différence significative à par rapport au témoin (ANOVA, Dunnett).

L'évolution du volume de l'œdème suite à l'injection de la CGN évolue de manière temps dépendante et selon le graphe peut être divisé en deux phases :

De 0 à 3h: L'œdème provoqué par l'agent phlogistique augmente progressivement et atteint une intensité maximale à 3h. A ce moment là, le pourcentage d'augmentation d'œdème a avoisiné les $118.66 \pm 5,23\%$ pour le lot témoin. Les mêmes résultats ont été obtenus par **Chao et al. (2009)** et **Morteza-Semnani et al. (2002)**.

De 3 à 6h : Tandis que le volume de patte chez le lot témoin reste relativement inchangé, l'évolution du volume des pattes chez les lots restants entre dans une phase de déclin, avec une diminution démarquant le lot standard des autres. Les pourcentages d'augmentation de l'œdème sont passés de $81,11 \pm 4,68\%$ à $20 \pm 3,84\%$ pour le lot traité au diclofénac respectivement (de la 3ème à la 6ème h).

Les résultats obtenus correspondent à ceux entrepris par **Chao et al. (2009)**; **Sofidiya et al. (2010)** et **Rodrigues et al. (2012)**. Il a été montré une évolution œdémateuse similaire, avec un pic atteint à la 3ème heure suivie d'une phase de déclin pour les lots traités avec le standard et les extraits. Ces observations sont caractéristiques du développement inflammatoire induit par la CGN.

En effet, l'induction œdémateuse par la CGN est un modèle utile d'évaluation de la contribution des médiateurs impliqués dans les changements vasculaires associés à l'inflammation aiguë. Décrit par **Vinegar et al. (1969)** : le développement de l'œdème de la patte en réponse à la CGN est biphasique (**Goshwami et al., 2013 ; Khabbal et al., 2006**). Ceci est expliqué par des événements différents qui se produisent dans les 2 phases.

Dans la première phase, celle allant de 0 à 3h, il a été rapporté que la vasodilatation observée au début de cette phase, dite "précoce", serait due à la libération d'amines vaso-actifs (histamine et sérotonine). Quant aux bradykinines (produits par la cascade des kinines plasmaticque aux alentours de 2h30), ils seraient responsables de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, causant ainsi un épanchement d'exsudat dans le foyer inflammatoire. Ces deux changements hémodynamiques atteignent un niveau accru à la 3ème heure après l'injection de la CGN (**Sharififar et al., 2012; Hemamalini et al., 2010**).

Dans la deuxième phase, celle allant de 3 à 6h, il a été observé un effet potentialisateur des changements hémodynamiques de la phase précédente, afin de permettre l'infiltration leucocytaire essentiellement constitué de PNN (**Liao, 2012**).

Cette dernière phase est caractérisée par la présence dans l'exsudat inflammatoire de produits issus de l'acide arachidonique, qui sont les prostaglandines et les leucotriènes. Des lors l'effet anti-inflammatoire de tel ou tel composé (à évaluer) découle de son action sur l'une de ces phases.

La légère diminution observée chez le lot témoin est certainement due aux mécanismes anti-inflammatoires naturels, en effet en réponse à l'inflammation, l'organisme produit des rétrocontrôles négatif à différents niveaux de la réaction inflammatoire, et ce en induisant l'expression de médiateurs anti-inflammatoires et la production d'hormones corticostéroïdiennes (**Popper et al., 1982**).

L'administration du Diclofénac sodique (50 mg/kg) au 2ème groupe, a exhibé une diminution significative ($p < 0.01$) de l'évolution de l'inflammation au niveau de la patte de la souris dès la 1ère heure. Avec un pourcentage d'augmentation de l'œdème de $25,55\% \pm 2,67$ qui est inférieur en comparaison avec celui du témoin négatif qui avoisine les $58,66 \pm 5,33$.

L'inhibition du volume de l'œdème atteint un seuil maximum à la 6ème heure après l'injection à la CGN avec un pourcentage de $78,31\% \pm 4,17$ (figure 25). Les résultats obtenus dans ce travail sont en accord avec ceux trouvés par (**Ananthi et al., 2010**), qui montrent un

effet préventif du diclofénac (25mg/kg) dans l'induction à la CGN (1%), avec un taux d'inhibition maximale obtenue à la 5ème heure (68,59%). D'autres essais antérieurs, incluant l'induction de l'œdème à la CGN (1% w/v), réalisés par **Sripanidkulchai et al. (2009)** et **De et al. (2010)** ont révélé des taux d'inhibitions maximales à la 6ème heure avec respectivement 50% et 67,4% à une concentration de 10mg/ml (D.c).

L'effet tardif du diclofénac sur la formation de l'œdème est en relation direct avec son mode d'action. L'activité des AINS sur la formation d'œdème induit par la CGN est bien connue. Ceci est en relation direct avec leurs propriétés de puissant inhibiteur de la synthèse des PGs, et ce par l'inhibition de la COX (Iso-formes 2) pendant la phase tardive de l'induction à la CGN (**Bose et al., 2007; Goshwami et al., 2013; Khabbal et al., 2006**). En effet il a été démontré que l'injection de la CGN induisait dès la 1ère heure la synthèse des COX-2 où elle atteint sa concentration maximale à 3h. Il s'en suit une augmentation des prostaglandines (notamment la PGE2) dont le pic maximal est observé à la fin de la phase précoce. Tout ceci expliquerait la forte réponse anti-inflammatoire tardive des AINS (**Riahi et al., 2011**).

L'administration de l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* aux doses de 100, 200 et de 400 mg/kg prévient de façon significative ($p < 0,01$) l'œdème plantaire chez la souris à partir de la 5ème heure du traitement (résultats non rapportés).

Le traitement avec ces doses provoque un effet inhibiteur de l'inflammation important et significativement différent du contrôle ayant reçu le sérum physiologique. A la 6ème heure, l'extrait éthanolique aux doses indiquées (100, 200 et 400 mg/kg) a montré respectivement un pourcentage d'inhibition maximale de $46.98\% \pm 6,09$, $48.19\% \pm 6,83$, $50.60\% \pm 3,45$ comme le montre figure 25.

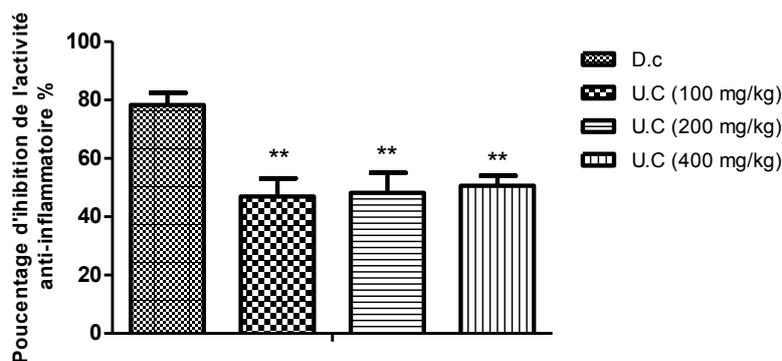


Figure 25 : Inhibition de l'œdème induit par la carragénine à la 6ème heure (histogramme).

L'évaluation du pourcentage d'inhibition révèle que l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* ne possède une activité anti-inflammatoire qu'à la 2ème phase du développement de l'œdème. En effet, aucune observation significative d'activité de l'extrait n'a été constatée dans la phase précoce, ce n'est qu'à partir de la 4ème heure que l'effet anti-inflammatoire de l'extrait a été déterminé.

D'autres essais antérieurs se sont révélés significatif quant à l'activité anti-inflammatoire d'extraits éthanoliques de différentes plantes médicinales.

Ainsi comme le montre le tableau VIII les résultats obtenus par **Awaad et al. (2011)** et **Amezouar et al. (2013)** suggèrent une activité anti-inflammatoire dans la première phase de l'inflammation produite par l'injection de la CGN, ceci reflète une action inhibitrice de la libération et/ou la production des médiateurs attribués a cette phase (5-HT, histamine et bradykinine).

Les autres travaux **Hivrale et al. (2013)**; **Alam et al. (2011)** et **Sofidiya et al. (2010)** montrent des % d'inhibitions maximales obtenues dans la 2^{ème} phase de l'induction à la CGN. L'activité anti-œdémateuse, en phase tardive, de ces extraits pourrait indiquer que comme les AINS, ils auraient un effet inhibiteur sur la synthèse des prostaglandines, et ce en passant par l'inhibition de la COX. Ceci pourrait expliquer le mode d'action des principes actifs retrouvés dans l'extrait brut de *Ulmus campestris*.

Tableau VIII : effet anti-inflammatoire des extraits éthanoliques de quelques plantes médicinales

Plantes	Extraits éthanoliques	% d'inhibition	Heure d'inhibition max	Références
<i>Alhagi maurorum</i>	Et-OH 1000mg/kg	60,71%	1ère heure	Awaad et al., 2011
<i>Conyza dioscoridis</i>	ET-OH 500mg/kg	61,86%	2ème heure	Awaadet al., 2011
<i>Erica arborea</i>	ET-OH 200mg/kg	42,7%	3èm heure	Amezouar et al., 2013
<i>Tamarindus indicca</i>	ET-OH 50mg/kg	33,49%	4ème heure	Hivrale et al., 2013
<i>Ammomum subulatum</i>	ET-OH 100mg/kg	48,57%	5ème heure	Alam et al., 2011
<i>Hymenocardia acida tul</i>	ET-OH 200mg/kg	85,71	6ème heure	Sofidiya et al., 2010

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris* observée, serait due à la richesse de la plante en composés bioactifs ; en effet, l'analyse phytochimique de

l'extrait brut de *Ulmus campestris* a exhibé une composition riche en polyphénols essentiellement : phénols totaux ($445.39 \pm 10.71 \text{ mg/kg}$), tannins ($1131.12 \pm 39.98 \text{ mg/kg}$) et flavonoïdes ($7.20 \pm 0 \text{ mg/kg}$), ce qui expliquerait son activité anti-inflammatoire. (travaux antérieurs).

D'après **Oseni et al. (2013)**, les flavonoïdes auraient un rôle crucial concernant l'activité anti-inflammatoire, ces composés seraient capables de prévenir et/ou d'atténuer les manifestations du processus inflammatoire, en agissant à différents niveaux.

Ainsi certains types de flavonoïdes (hesperetin, myricetine, wogonine, nobiliten, quercetine) auraient des vertus anti-inflammatoires en agissant sur la synthèse et/ou la production de médiateurs inflammatoires tels que les prostaglandines, NO , $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ et les leucotriènes. Leur mode d'action passerait par l'inhibition de l'expression de gènes codants pour des enzymes pro-inflammatoire comme la COX2, la phospholipase A2, la lipo-oxygénase, la iNOS, l'action sur la transcription de ces gènes indique que ces composés agiraient en supprimant l'activation du facteur de transcription NF-kB.

Aussi, la diosine (flavonoïde) exprimerait son potentiel anti-inflammatoire par l'inhibition de l'expression de molécules d'adhérences (contribuent à la migration leucocytaire) telles que I-CAM1 et V-CAM1 (**Goetz, 2011**).

Selon l'origine de la réaction inflammatoire, y compris celle induite par la CGN, son évolution diffère pour aboutir au même résultat final c'est-à-dire à une accumulation de polynucléaires neutrophiles au site inflammatoire et à des lésions cellulaires et tissulaires. L'examen histopathologique de la patte arrière de souris (traitée à l'eau physiologique) observés sous microscopie optique, cinq heure après induction œdémateuse par la CGN, s'est révélé riche en population neutrophilique comparativement avec les groupes de souris traités avec un anti-inflammatoire standard (**Deng et al., 2011 ; Liao et al., 2012**).

En effet, la phase tardive de l'inflammation induite à la CGN est fortement liée à une infiltration importante de neutrophiles polynucléés, par conséquent cette infiltration est productrice d'enzymes protéolytique, de médiateurs pro-inflammatoires (PGs, leucotriènes, cytokine), de stress oxydatif libérant ainsi, des espèces réactives de l'oxygène (H_2O_2 , $\dot{\text{O}}\text{H}$, $\text{NO}\cdot$). Ils sont donc les effecteurs principaux de cette phase.

Selon **Chang et al. (2011)**, la présence de PNN pourrait entretenir l'état inflammatoire induit par la CGN, et ce par déversement de leurs produits dans le foyer.

En effet, ces dernières années **Cuzzocrea et al. (1998)** s'est fortement intéressé à la contribution du radical oxyde nitrique (NO) dans l'inflammation aigüe, Le NO est un radical synthétisé à partir de la L-argénine. La réaction est catalysée par l'enzyme NO Synthase (NOS).

La présence de NO dans le foyer inflammatoire accentue l'œdème, par ses effets vasodilatateurs. La production de NO au cours de l'inflammation aigüe est corrélée à l'induction d'une iso-forme de la NOS, il s'agit de la iNOS (inducible NO Synthase), il semblerait que comme la COX 2, cette iso-enzyme ne se serait exprimée qu'au cours du processus inflammatoire (**Cuzzocrea et al., 1998**).

Dès lors, des études récentes se sont focalisées sur l'effet de plantes médicinales concernant la production de NO au cours de l'inflammation aigüe.

L'administration de l'extrait éthanolique de *Mahonia oiwakensis* (aux concentrations de 100mg/kg et 500mg/kg) a significativement ($P < 0,01$) diminué le taux de NO au niveau du foyer inflammatoire ainsi qu'au niveau sérique, en regard du groupe traité avec le placebo (**Chao et al., 2009**). De surcroît **Liao et al. (2012)** a déterminé par immunocytochimie, l'activité inhibitrice exercée sur la iNOS, de l'extrait éthanolique (250mg/kg, 500mg/kg, 1000mg/kg) de *Taxillus liquidambaricola*. De plus, l'immunohistochimie des protéines extraites des pattes de souris (traitées avec le même extrait), six heures après l'injection de la CGN, a révélé une inhibition de la iNOS hautement significative ($P < 0,001$). Ce qui pourrait aussi contribuer à l'explication de l'effet de *Ulmus campestris* sur la phase tardive par une action antioxydante (NO) ou par une activité inhibitrice de la iNOS.

Le stress oxydatif est défini comme une oxydation intracellulaire excessive due à un déséquilibre entre la production d'espèces oxydantes ou formes réactives de l'oxygène (ERO) et celle des systèmes antioxydants (**Pasquier, 1995**).

Les EROs sont responsables de la dénaturation et de la dégradation des molécules biologiques (lipides, protéines, ADN et glucides) et sont impliquées dans les lésions tissulaires observées au cours du processus inflammatoire. Elles sont produites au cours de divers processus biologiques par un grand nombre de cellules et en particulier par les cellules phagocytaires, comme les PNN. Il semble donc évident que le stress oxydatif soit étroitement lié à l'inflammation (relation de cause à effet) (**Sofidiya et al., 2010**).

L'inflammation aigüe induite par la CGN est caractérisée par la production cellulaire (PNN) des EROs, responsable de lésions tissulaires. L'effet cytotoxique des EROs semble être responsable de l'entretien de la réaction inflammatoire.

D'après **Ratnasooriya et al. (2005)**, l'œdème induit par la CGN est sensiblement réduit par les composés aux vertus antioxydantes, plusieurs essais phyto-pharmacologiques démontrent une corrélation entre l'activité anti-inflammatoire et antioxydante.

D'après ces expertises, l'effet anti-inflammatoire de leurs extraits végétaux respectifs découle de la propriété de piégeage des EROs, des molécules bioactives qui les constituent.

L'évaluation *in vitro* de l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de *Ulmus campestris*, a été réalisée par des travaux antérieurs (**Debbache et al., 2008**). En effet l'activité scavenger (piégeage) de l'extrait éthanolique vis à vis du radical 1,1, diphenylpicrylhydrazil (DPPH), du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), et de l'hydroxyle (OH[·]) qui sont respectivement de 87.27±0.14%, 92.16±0.86% et de 59,81±4,95%.

Les résultats obtenus confèrent à l'Ulmaceae le statut de puissant antioxydant, ce qui permet d'attribuer, du moins en partie, l'effet anti-inflammatoire de *Ulmus campestris* à ses propriétés antioxydantes.

IV-2-Toxicité aigüe :

Les différentes observations émises durant les 96h sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau IX : Résultats du test de la toxicité aigüe de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris*

Extraits	Asthénie	Convulsion	Horripilation	Agitation	Salivation	Mortalité	Appétit	Soif
témoin	0	0	0	0	0	0	/	/
100mg/kg	0	0	0	0	0	0	/	/
200mg/kg	0	0	0	0	0	0	/	/
400mg/kg	0	0	0	0	0	0	/	/
1000mg/kg	2♂	0	0	0	0	0	/	/
2000mg/kg	2♂,2♀	0	0	1♀	0	0	/	/
3000mg/kg	0	0	0	0	0	0	↓	↑

↑ : Augmentation ↓ : Diminution, / : pas d'observation, ♀ : femelle, ♂ : mâle

Comme le montre le tableau IX, aucune mortalité et aucun changement comportemental n'a été observée après l'administration orale de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris* pendant la période d'évaluation (4 jours), même à la dose la plus élevée (3000 mg / kg), à l'exception de faiblesse observée chez 2 souris mâles à la concentration de

1000mg/kg ainsi qu'à la concentration de 2000mg/kg avec un ratio (2♂2♀). L'administration de l'extrait à 3000mg/kg a exhibé une augmentation de la soif et une légère diminution de l'appétit chez tout le lot en comparaison avec le lot témoin. Ces observations ne semble exprimer aucune significativité et ce conformément aux résultats de **(Gupta et al., 2010; Ezeonwumelu et al., 2012)**.

L'extrait éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris* ne présente donc aucun effet secondaire et ce même à la dose de 3g/kg. Le test de la toxicité aigüe démontre la totale innocuité de l'écorce de la plante médicinale.

Conclusion

La substitution des traitements synthétiques de la physiopathologie de l'inflammation est une priorité absolue de la communauté scientifique. Dans ce contexte, le recours aux principes bioactifs extraits de plantes médicinales, comme *Ulmus campestris*, devient une importante voie alternative à explorer afin de concevoir de nouvelles molécules efficaces et à moindres effets secondaires.

L'administration orale de l'extrait éthanolique de l'écorce de *Ulmus campestris* à raison de 100 mg/kg, 200 mg/kg et 400 mg/kg, a montré un effet inhibiteur significatif ($P < 0,001$) de l'inflammation aigüe induite par la λ -carragénine au niveau de la patte de souris en agissant sur la deuxième phase de l'inflammation locale. L'activité anti-inflammatoire maximale est observée à la sixième heure et exhibe des pourcentages d'inhibitions de 46.98%, 48.19%, 50.60% respectivement pour l'extrait éthanolique à 100 mg/kg, 200 mg/kg et 400mg/kg. L'administration du diclofénac sodique, un anti-inflammatoire non stéroïdiens, a significativement ($P < 0,001$) réduit l'œdème, dès le début de la deuxième phase de l'inflammation, avec un effet maximale aux environs de la sixième heure après injection sub-plantaire de l'agent phlogogène utilisé.

Les résultats obtenus ont permis de suggérer que l'extrait testé contient des molécules pharmacologiques actives. Ces dernières sont regroupées sous la famille des polyphénols, elles ont notamment prouvées leurs efficacités vis-à-vis de l'inflammation, de part et d'autre du monde. Leurs modes d'actions ont principalement été corrélés à l'inhibition de la synthèse, et du relargage des médiateurs et des enzymes pro-inflammation (NO, iNOS, PGE2, PLA2, COX-2, TNF α , histamine et bradykinine). L'effet anti-inflammatoire de ces composés découlerait aussi de leur puissant effet antioxydant, tout comme l'extrait brut de *Ulmus campestris*, aiguillant ainsi les hypothèses formulées quant à l'activité anti-inflammatoire de cette plante médicinale.

Le test de la toxicité aigüe de cette plante, a permis de conclure que l'extrait éthanolique de l'écorce ne présente aucune toxicité et ce même à une dose de 3 g/kg.

La propriété pharmacologique de l'écorce de *Ulmus campestris* révélée dans ce travail, justifie son application dans la phytothérapie traditionnelle et pourrait indiquer la possibilité de son usage thérapeutique comme anti-inflammatoire.

L'évaluation entreprise dans cette présente étude n'est qu'une ébauche concernant les mécanismes d'actions des polyphénols de l'extrait brut de *Ulmus campestris*, il serait

intéressant de découvrir les cibles moléculaires de ces derniers lors de la réaction inflammatoire. Des analyses immunohistopathologique et immunocytochimique sont donc nécessaires afin de révéler l'étendue des vertus de cette plante.

La complexité de cet extrait brut ne permet d'obtenir qu'un aperçu de son réel potentiel pharmacologique, dans cet esprit l'isolement et l'identification des composés actifs présents dans l'écorce de l'ulmâcés sont les principaux objectifs à atteindre. Il semblerait que la chromatographie liquide de haute performance (HPLC) soit une référence de premier choix quant à l'identification de famille moléculaire, comme les polyphénols. Outre ces avantages, cette technique d'analyse permet de séparer les analytes en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et ce sous différents modes. Afin d'optimiser la séparation, il serait intéressant de coupler la HPLC à d'autres systèmes de détection tels que la spectrométrie de masse ou la résonance magnétique nucléaire. Cette méthode d'analyse pourrait être la plus appropriée à l'identification des bio-médicaments de l'extrait vu sa richesse en différents composés polyphénoliques.

Afin de confirmer la totale innocuité de cet extrait, il serait envisageable de déterminer la dose létale 50 et d'évaluer la toxicité chronique, ceci dans le but d'une application pharmaceutique future.

Références bibliographiques

A

- **Aguilar, J.L., Rojas, P., Marcelo, A., Plaza, A., Bauer, R., Reiningerc, E., Klaas, C., Merfort, I., (2002).** Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 271-276.
- **Alam, K., Pathak, D., Ansari, S.H., (2011).** Evaluation of Anti-inflammatory Activity of *Ammomum subulatum* Fruit Extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 3(1) 35-37.
- **Amezouar, F., Badri, W., Hsaine, M.N., Bourhim, B.H., (2013).** Evaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de *Erica arborea* L. Du Maroc. *Pathologie biologique. Phytothérapie*, 6, 228–231.
- **Ananthi, S., Balaji Raghavendran, H.R., Sunil, A.G., Gayathri, V., Ramakrishnan, G., Vasanthi, H.R., (2010).** In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 187–19.
- **Aquila, S., Giner, R.M., Recio, M.C., Spegazzini, E.D., Ríos, J.L., (2009).** Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Cayaponia tayuya* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, (121) 333–337.
- **Arnaud, L., Haroche, J., Piette, J-C., Amoura, Z., (2009).** Les biothérapies immunomodulatrices du futur : quelles perspectives ? . *Presse Med*, (38) 749–760.
- **Awaad, A.S., El-meligy, R.M., Qenawy, S.A., Atta, A.H., Soliman, A.G., (2011).** Anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of some desert plants. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 367-373.

B

- **Bannwarth, B., Berenbaum, F., (1999).** Nouveaux anti-inflammatoires non stéroïdiens : donneurs de NO et inhibiteurs selectifs de COX-2. *Rev Méd Interne*, 20 (3), 341-5.
- **Beloued, A. (2001).** Plantes médicinales d'Algerie. Office des publications Universitaires. Algerie. 368p.

- **Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., Sapirstein, H.D., (2005).** Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chem*, 82, 390-393.
- **Bonghi, C., Rizzini, F.M., Gambuti, A., Moio, L., Chkaiban, L., Tonutti, P., (2012).** Phenol Compound metabolism and gene expression in the skin of wine grape (*Vitis vinifera* L.) berries subjected to partial postharvest dehydration. *Postharvest biology and technology*, 67, 102-109.
- **Borthakur, A., Bhattacharyya, S., Pradeep, K., Dudeja, Tobacman, J.K., (2007).** Carrageenan induces interleukin-8 production through distinct Bcl10 pathway in normal human colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, 829-838.
- **Bose, A., Mondal, S., Gupta, J.K., Ghosh, T., Dash, G.K., Si, S., (2007).** Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. *Fitoterapia*, 78, 515-520.
- **Brandstätter, H., Caroline, Samer, F., Ribi., Valérie., Piguët, C., (2010).** Réactions d'hypersensibilité immédiates aux anti-inflammatoires non stéroïdiens : allergie ou pseudo-allergie ?. *Revu Med Suisse*, 6, 1345-1350.
- **Brunton, J., (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. *Lavoisier. TEC et DOC*. Paris. p1269.
- **Brzozowska, J., Hanower, P., (1976).** Sur les composés phénoliques avec un déficit hydrique chez des cotonniers des végétaux et . *Annales de l'Université d'Abidjan*, 12.

C

- **Capron, F., (1998).** Forme anatomo-clinique de l'inflammation, in trouble de la mortalité et de la sensibilité digestive. *Revue du praticien*, 20, 2273-2276.
- **Cavaillon, J.M., (2000).** Rôle des glucocorticoïdes dans la cascade inflammatoire. *Reanim Urgences*, 9, 605-12.
- **Cavaillon, J.M., (1995).** L'inflammation : un équilibre précaire entre cytokines pro- et anti-inflammatoires. *Revue française des laboratoires*, (276).
- **Chang, H.Y., Sheu, M.J., Yang, C.H., Lu, T.C., Chang Y.S., Peng, W.H., Huang, S.S., Huang, G.J., (2011).** Analgesic Effects and the Mechanisms of

Anti-Inflammation of Hispolon in Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p8.

- **Chao, J., Lu, T-C., Liao, J.W., Huang, T.H., Lee, M.S., Cheng, H.Y., Ho, L.K., Kuo, C.L., Peng, W.H., (2009).** Analgesic and anti-inflammatory activities of ethanol root extract of *Mahonia oiwakensis* in mice . *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 297–303.
- **Charbonnel, B., Kremer, M., (1982).** Les prostaglandines et substances apparentées. *La Revue de Medecine imerne*, 3 (2) 163-174.
- **Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J.M, Ghoul, M., (2006).** Enzymatic acylation of flavonoids. *process biochemistry*, 41, 2237-2251.
- **Chevalier, X., Flipo, R., Goupille, P., Schaefferbeke, T., (2005).** Rhumatologie. France Eds, *Elsevier Masson*, p340.
- **Chiolero, A., Würzner, G., Burnier, M., (2000).** Les inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2:moins d'effets rénaux que les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques?, *Néphrologie*, 21(8) 425-430.
- **Cho, H., Yun, W.C., Park, K.W., Kong, Y.G., Kim, S.K., Park, Y., Lee, S., Kim, K.B., (2004).** Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. *Pharmacological Research*, 49, 37-43.
- **Cohen, Y., Jacquot, C., (2008).** Anti-inflammatoire. *Pharmacologie*, 324-342.
- **Coyen, Y., (1990).** Les médiateurs chimiques de l'inflammation, in Abrégé de pharmacologie. *Ed.3 Masson*, Paris, 350 P.
- **Crouzilles, C., Siebert, C., (2010).** *Processus inflammatoires et infectieux*. Italie: Elsevier Masson. p 25-134.
- **Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Hake, P., Salzman, A.L., Szabo, C., (1998).**
Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(3)450-459.
- **Cynober, L., (2000).** Médiateurs de l'inflammation : controle par les nutriments azotés. *Nutr Clin Mdtabol*, 14, 194-200.

D

- **De, S., Nandan, d.y., Ghosh, k.A., (2010).** Anti-inflammatory activity of methanolic extract of *amorphophallus paeoniifolius* and its possible mechanism. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1, 1-8.
- **Debbache, N., Boudaouad, H., Atmani, D., Chahir, N., Atmani., (2008).** Antioxidant activity of extracts of three Algerian medicinal plants: *Clematis flammula*, *Populus nigra* and *Ulmus campestris*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 150, S180–S185. Abstracts .
- **Deng, J.S., Chi, C.S., Huang, S.S., Shie, P.H., Lin, T.H., Huang, G.J., (2011).** Antioxidant, analgesic, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extracts of *Taxillus liquidambaricola*. *Journal Of Ethnopharmacology*, 137, 1161-1171.
- **Derrier, M., Mercatello, A., (1997).** Place des anti-inflammatoires non stéroïdiens en période périopératoire Intérêt et limites. *Ann Fr Anesth rianim*, (16) 498-520.
- **Devillier, Ph., Millart, H., Advenier, C., (1996).** Action anti-inflammatoire des glucocorticoides. *Revue française*, 36(8) 937-941.
- **Diebold, J., Molina, T., Bigorgne, C., Audouin, J., Tourneau, A., (1995).** Les expressions morphologiques de la réaction inflammatoire. *Revue française des laboratoires*, (276).
- **Diouf, A., (1991).** Etude des médiateurs et leurs rôles physiopathologiques. *Thèse Pharmacie*, 44 P.
- **Duwiejua, M., Zeitlin, I.J. (1993).** **Plants** as source of anti-inflammatory substances. In : *Drugs from Natural Products: Pharmaceuticals and Agrochemicals*. Harvey A L. Eds, Taylor & Francis (Royaume-Uni), p 153.

E

- **Ezeonwumelu, J.O.C., Omar, A.N., Ajayi, A.M., Okoruwa1, A.G., J.K., Tanayen, D.M., Kiplagat, O.A., Okpanachi, S., Abba, Ezekiel, A.N., Onchweri, C.O., Okonkwo, F., Byarugaba., (2012).** Phytochemical screening, acute toxicity, anti-inflammatory and anti-pyretic studies of aqueous extract of the root of *Flueggea virosa* (Roxb. ex Willd.) in rats . *Int J Pharm Biomed Sci*, 3(3), 128-135.

\mathcal{F}

- **Faure, S., (2009).** Anti-inflammatoires stéroïdiens. *Actualités pharmaceutiques*, (487).
- **Franco, D., Robertson, Locksley., (2009).** *La repense immunitaire et les maladies infectieuses et inflammatoires*. Masson. P 80-85.
- **Fricker, M., Pichler, W., Helbling, A., (2011).** Intolérance aux inhibiteurs de la synthèse des prostaglandins. *Forum Med Suisse*, 11(32–33)542–546.
- **Funakoshi-Tago, M., Nakamura, K, Tago, K., Mashino, T., Kasahara, T., (2011).** Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *Int Immunopharmacol*, 11(9) 1150-9.

 \mathcal{G}

- **Ghédira, K., (2005).** Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4, 162-169.
- **Goetz, P., (2011).** Phytothérapie de l'inflammation (partie I). *Phytothérapie*, (9) 310-317.
- **Gonzalez-Gallego, J., Garcia-Mediavilla, M.V., Sanchez-Campos, S., (2010).** Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *Br J Nutr*, 104, 15-S27.
- **Goshwami, D., Rahman, M.d.M., Muhit, M.d.A., Islam, M.d.S., (2013).** Antinociceptive, Anti-inflammatory and Antipyretic Activities of Methanolic Extract of *Lasia spinosa* Leaves. *international journal of pharmaceutical and chemical sciences*, 2 (1).
- **Gruys, E., Toussaint, M.J., Niewold, T.A., (2005).** Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*, 6, 1045-1056.
- **Guilpain, P., Le Jeune, C., (2012).** Effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs des glucocorticoïdes. *Presse Med*, (41) 378–383.
- **Guo, W., Kong, E., Meydani, M., (2009).** Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutr Cancer*, 61, 807-810.
- **Gupta, M., Mazumder, U.K., Sambath Kumar, R., Gomathi, P., Rajeshwar, Y., Kakoti, B.B., Selven, T.V., (2010).** Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 98, 267–273.

H

- **Haeffner-Cavaillon, N., (1998).** La réponse inflammatoire. Première partie. *La Revue de Médecine Interne*, 19 (8) 585-588.
- **Han, X., Shen, T., Lou, H., (2007).** Dietary polyphenols and their Biological sbgnificance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8, 950-988.
- **Hawkey, C.J., (1999).** COX-2 inhibitors. *Lancet*, 353, 307-314.
- **Hemamalini, K., Prasad, Naik, K., Ashok, P., (2010).** Anti inflammatory and analgesic effect of methanolic extract of Anogeissus acuminata leaf. *Int J Pharm Biomed Res*, 1(3) 98-101.
- **Hivrle, M.G., Bandawane, D.D., Mali, A.A., (2013).** Anti-inflammatory and analgesic activities of petroleum ether and ethyl acetate fractions of Tamarindus indica seeds. *Orient Pharm Exp Med*. 13, 113-116 .

J

- **Jeon, H.J., Kang, H.J., Jung, H.J., Kang, Y.S., Lim, C.J., Kim, Y.M., Park, E.H., (2008).** Anti-inflammatory activity of *Taraxacum officinale*. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 82-88.

K

- **Khabbal, Y.M., Cadi Ait, E., Alaoui, K., Mg.A, Faouzi., Cherrah,Y., (2006).** Activit anti-inflammatoire de Zygophyllum goetulum. *Phytothérapie Numéro*, 5, 227-229.
- **Kim, H.P., Son, K.H, Chang, H.W., (2004).** Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci*, 96, 229-245.

L

- **Larrosa, M., M.J. Yanez-Gascon, M.V., Selma., (2009).** Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *J Agric Food Chem*, 57, 2211-2220.
- **Leone, M., Garcin,F., Chaabane, W., Boutière-Albanèse, B., Albanèse, J., Dignat-Georges, F., Martin, C., (2003).** Activation des molécules d'adhésion chez

les patients en choc septique. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 22(8) 721-729.

- **Leroy, K., Copie-Bergman, C., (2003).** Anomalies cytogénétique des lymphomes B de la zone marginal de type MALT gastriques : conséquences physiopathologiques et corrélations cliniques. *Hématologie*, 9(2) 151-60.
- **Liao, J.C., Deng, J.S., Lin, Y.C., Lee, C.Y., Lee, M.M., Hou, W.C., Huang, S.S, Huang, G.J., (2012).** Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activities From *Actinidia callosa* var. *callosa* In Vitro and *In Vivo*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. P1*

M

- **Male, D., (2005).** *Immunologie aide-mémoire illustré*. Boek et Lacier, 143p.
- **Male, D., Jonathan, B., David, B., Rott, Ivan., R., (2007).** *Immunologie*. Paris : Elsevier Masson. Dragos, B, p141-159.
- **Marfaing-Koka, A., (1998).** Les chimiokines. *Revue française des laboratoires*, (308) 37-44.
- **Miossec, P., (2003).** Physiopathologie de l'inflammation. *La revue du praticien*, 53,1-7.
- **Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi., K., Takafumi, Y., Kumazawa, Y., Morikawa, S., (2003).** Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Cell Mol Life Sci*, 228, 228-8533.
- **Morteza-Semnani, K., Saeedi, M., Hamidian, M., Vafamehr, H., Dehpour, R.A., (2002).** Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Glaucium grandiflorum* extract. *Journal of Ethnopharmacology* , 80, 181-186.
- **Muster, D., (2005).** Médicaments de l'inflammation. *EMC-Stomatologie*, 1, 21–29.

N

- **Ndiaye, M., Gy, S., Dièye, A., Touré, M, Faye, B., (2006).** Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de feuilles d'*annona reticulata* (annonaceae) sur l'œdème aigu de la patte de rat indit par la carragénine. *Pharm. Méd. Trad. Afr*, 24, 179-186.

- **Niessner, M., Volk, B.A., (1995).** Phenotypic and immunoregulatory analysis of intestinal T-cells in patients with inflammatory bowel disease: evaluation of an in vitro model. *Eur J Clin Invest*, 25, 155-164.

O

- **Odontuya, G., Hout, J.R., Houghton, P.J., (2005).** Structure-activity relationship for antiinflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytother Res*, 19(9) 782-6.
- **Oseni, L.A., Amiteye, D., Antwi, S., Tandoh, M., Aryitey, G.M., (2013).** Preliminary in vivo evaluation of anti-inflammatory activities of aqueous and ethanolic whole plant extracts of *Phyllanthus fraternus* on Carrageenan-induced Paw Oedema in Sprague-Dawley Rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (03) 062-065.

P

- **Panthong, A., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., Wongcome, T., Reutrakul, V., (2003).** Anti-inflammatory and antipyretic properties of *Clerodendrum petasites* S. Moore. *Journal of Ethnopharmacology*, (85) 151–156.
- **Pasquier, C., (1995).** Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires*, (276).
- **Popper, H., Picher, O., Auer, H., (1982).** Reduction of carrageenan- bradykinin- and histamine-induced acute inflammation by experimental eosinophilia in rats. *Immunology*, 46- 589.

R

- **Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E., (2007).** *Composition moléculaire des cellules végétales. Biologie végétale.* Bruxelles, Groupe de Boeck. P 27-32.
- **Raymondjea, M., (2007).** Les mécanismes de l'inflammation périphérique. *Revue francophone des laboratoires*, (389).

- **Riahi, R.C., Tarhouni, S., Kharrat, R., (2011).** Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer méditerranéenne. *Archs. Inst. Pasteur Tunis*, 88, 1-4.
- **Rodrigues, J.A.G., Edfranck, S.O., Vanderlei, M.C.M., Silva Ianna, W.F., Araújo Ismael, N.L., Queiroz Gabriela, A., Paula Ticiania, M., Abreu, N., Ribeiro, A., Mirna M., Helliada, V., Chaves, V.L., Roberta, J.B., Helena, S.A., Monteiro, S., (2012).** Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. *Pharmacological Reports*, 64, 286-292.
- **Roux, D., Catier, O., (2007).** *Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie page chapitre phytothérapie , edition: wolters kluwer, p109- 112.*
- **Roux, H., (1990).** Mise au point sur les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Médecine d'Afrique Noire*, 37 (4).

S

- **Salas-Salvado, J., Fernandez-Ballart, J., Ros, E., (2008).** Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the Predimed randomized trial. *Arch Intern Med*, 168, 2449-2458.
- **Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., (2007).** Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita*, 43, 394-405.
- **Setty, A.R., Sigal, L.H., (2005).** Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 34, 773-784.
- **Sharififar, F., Khazaeli, P., Alli, N., Talebian, E., Zarehshahi, R., Amiri, S., (2012).** Study of antinociceptive and anti-inflammatory activities of certain Iranian medicinal plants. *J Intercult Et hnopharmacol*, 1 (1), 19-24.
- **Sofidiya, M.O., Odukoya, O.A., Adedapo, A.A., Mbagwu, H.O.C., Afolayan, A.J., Familoni, O.B., (2010).** Investigation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Hymenocardia acida* Tul. (Hymenocardiaceae). *African Journal of Biotechnology*, 9 (49), 8454-8459.

- **Soulimani, R., Younos, C., Jarmouni-Idrissi, S., Bousta, D., Khalouki, F., Laila, A., (2001).** Behavioral and pharmaco-toxicological study of *Papaver rhoeas* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, (74) 265–274.
- **Sripanidkulchai, B., Junlatat, J., Wara-aswapati, N., Hormdee, D., (2009).** Anti-inflammatory effect of *Streblus asper* leaf extract in rats and its modulation on inflammation-associated genes expression in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 566–570.
- **Stevenson, D.E., Hurst, R.D., (2007).** Polyphenolic phytochemicals--just antioxidants or much more?. *Cell Mol Life Sci*, 64(22) 2900-16.

T

- **Takano-Ishikawa, Y., Goto, M., Yamaki, K., (2006).** Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*, 13(5) 310-7.
- **Tapiero, H., Tew, K.D., Ba, G.N., Mathé, G., (2002).** Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?. *Biomed Pharmacother*, 56(4) 200-7.
- **Thififin, G., (1991).** Epidémiologie et traitement des lésions gastroduodénales provoques par les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens . *Rev Med Interne* , 12, 227-236.
- **Timbo, B. (2003).** Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica*.

V

- **Vinegar, R., Schrebier, W., Hugo, R., (1969).** Biphasic development of carrageenin- induced oedema in rat. *J Pharmacol Exp Ther* , 166, 96-103.

W

- **Wiert, C., (2006).** Ethnopharmacology of Medicinal Plants: Asia and the Pacific. *Eds, Humana Press (Totowa)*, 1-20.

- **Wichtl, M., Anton, R., (2003).** *Plantes thérapeutiques*. In Lavoisier. TEC and DOC Paris P687.
- **Winter, C.A, Risley, E.A, Nuss, G.W., (1962).** Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* , 111, 544–547.

Z

- **Zhu, Z.Z., Ma, K.J., Ran, X., Zhang, H., Zheng, C.J., Han, T., Zhang, Q.Y., Qin, L.P., (2011).** Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 1126–1131.
- **Ziltener, J.L., Leal, S., Fournier, P-E., (2010).** Non-steroidal anti-inflammatory drugs for athletes: An update. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 53, 278–288.

Résumé:

L'inflammation est un processus biologique impliqué dans diverses pathologies. Sa prise en charge par les anti-inflammatoires de synthèse est délétère et lourde de conséquence pour l'organisme, pour cela Les plantes médicinales pourraient contribuer à l'élaboration de nouveaux médicaments entraînant ainsi moins d'effets secondaires. La présente étude porte sur l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire et de la toxicité aigüe *in vivo* des extraits éthanolique de *Ulmus campestris*. L'activité anti-inflammatoire a été évaluée à l'aide du modèle de l'œdème plantaire induit chez la souris par la carragénine. L'administration par voie orale de l'extrait éthanolique aux doses de 100, 200 et 400 mg/kg a prévenu l'œdème plantaire de façon significative ($P < 0,001$) avec des pourcentage d'inhibition maximale de (46.98%, 48.19% et 50.60% respectivement), observée durant la deuxième phase de l'inflammation aigüe induite par l'agent phlogogène, en comparaison avec les souris ayant reçus du sérum physiologique. L'effet anti-œdémateux de l'extrait brut revient à sa richesse en polyphénols qui auraient une action inhibitrice sur les médiateurs de l'inflammation. La toxicité aigüe a été évaluée par l'administration par voie orale de hautes concentrations d'extrait chez la souris, les résultats n'ont montré aucun signe délétère et ce même à la dose de 3 mg/kg. Les résultats de cette étude montrent que les composés bioactifs contenus dans l'écorce de *Ulmus campestris* seraient doués de propriétés anti-inflammatoires intéressantes, suggérant une application thérapeutique afin de prévenir le processus inflammatoire.

Mots clés : *Ulmus campestris*, carragénine, inflammation, œdème, toxicité, polyphénols, anti-inflammatoire.

Abstract:

The inflammation is a biological process implied in various pathologies. Its assumption of responsibility by anti-inflammatory drugs of synthesis is noxious and heavy of consequence for the organism, for that the medicinal plants could contribute to the development of new drugs involving thus less side-effects. The present study relates to the evaluation of the anti-inflammatory drug activity and the acute toxicity *in vivo* of the ethanolic extracts of *Ulmus campestris*. The anti-inflammatory drug activity was evaluated using the model of the plantar oedema induced in the mouse by the carrageenan. The administration by oral way of the ethanolic extract to the amounts of 100.200 and 400 mg/kg prevented the plantar oedema to a significant degree ($P < 0,001$) with percentage of maximum inhibition at (46.98%, 48.19% and 50.60% respectively), observed during the second phase of the acute ignition induced by the agent phlogogene, in comparison with the mice having received physiological salt solution. The anti-edematous effect of the rough extract returns to its high content in polyphenols which would have an inhibiting action on the mediators of inflammation. The acute toxicity was evaluated by the administration by oral way of high concentrations of extract in the mouse, the results did not show any noxious sign and this same with the amount of 3 mg/kg. The results of this study show that the compounds bioactifs contained in the bark of *Ulmus campestris* would be endowed with interesting properties anti-inflammatory drugs, suggesting a therapeutic application in order to prevent the inflammatory process.

Keywords: *Ulmus campestris*, carrageenan, inflammation, oedema, toxicity, polyphenols, anti-inflammatory.