

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences Exactes
Département de Chimie
Laboratoire Biomathématiques Biophysique Biochimie et de Scientométrie

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT LMD

Domaine : Sciences de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie Appliquée

Présentée par
Madame Nadjat Bouchara-Arab

Thème

*Caractérisation du pouvoir anti-inflammatoire aux effets prolongés de la
plante médicinale Artemisia herba-alba*

Soutenue le : 24/03/2022

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme Lila Boulekbache-Makhlouf

Pr Univ. De Bejaia

Président

Mr Khodir Madani

Pr Univ. De Bejaia

Rapporteur

Mr Adrien Rossary

MCU Univ. De Clermont-Ferrand

Co-rapporteur

Mme Leila Mahtout-Ait Braham

Pr Univ. De Bejaia

Examineur

Mr Farouk Rezgui

Pr Univ. De Bejaia

Examineur

Mr Omar Aoun

Pr Univ. De M'Sila

Examineur

Mme Florence Caldéfie-Chezet

Pr Univ. De Clermont-Ferrand

Invité

Mme Marie-Paul Vasson

Pr Univ. De Clermont-Ferrand

Invité

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biomathématiques, Biophysique, Biochimie et Scientométrie de l'Université de Bejaia sous la direction de Monsieur le Professeur Khodir Madani. Je tiens particulièrement à lui exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements pour m'avoir guidée tout au long de cette étude. Je lui suis également reconnaissante pour la liberté qu'il m'a accordée dans les orientations de mes recherches et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée.

Les mesures des activités enzymatiques ont entièrement été réalisées au sein du Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition de la Faculté de pharmacie de Clermont-Ferrand sous la codirection du Docteur Adrien Rossary MCU-UCA pour qui, j'exprime toute ma gratitude et mon profond respect pour avoir accepté de co-diriger mon travail de thèse, pour ses explications logiques et ses précieux conseils tout au long de mon séjour scientifique à Clermont-Ferrand.

Les mesures de la viabilité cellulaire ainsi que les cinétiques de la production des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) ont été réalisées au Laboratoire de Pharmacognosie sous la supervision de Madame le Professeur Florence Caldefie-Chezet, chef de l'équipe ECREIN à l'Université de Clermont-Ferrand. J'ai apprécié sa confiance envers moi lors de l'utilisation des divers équipements de laboratoire durant mon étude. Ainsi que ses précieux conseils et orientations thématiques. Cette contribution m'a permis de maîtriser des techniques biologiques très utiles et de progresser dans mon travail.

Mon respect et mes remerciements les plus profonds vont particulièrement à Madame le Professeur Marie-Paul Vasson, Directrice du Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition de la Faculté de pharmacie de Clermont-Ferrand pour m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire, ainsi que pour sa confiance placée en moi et ses encouragements.

Je tiens à témoigner mes sincères remerciements à mon époux le Docteur Khelifa Arab, Scientifique au Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ-Heidelberg et membre

derecherche à l'Institut of Molecular Biologie, IMB-Mainz. Ses remarques pertinentes lors de l'interprétation de mes résultats étaient déterminantes. Je tiens à saluer sa disponibilité, ses enseignements, sa simplicité, sa patience ainsi que sa générosité scientifique.

Je remercie Madame Lila Boulekbache-Makhlouf, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la vie de l'Université A. Mira, Bejaia, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance de mathèse de doctorat.

Je remercie également Monsieur Farouk Rezgui ainsi que Madame Leila Mahtout-Ait Braham Professeurs à l'Université A. Mira, Bejaia. Ainsi que le Professeur Omar Aoun de l'université de M'Sila, pour avoir accepté d'examiner ma thèse. Je reste convaincue que le temps qu'ils ont consacré à l'examen de mon travail contribuera à améliorer sa qualité.

Je tiens à remercier le Docteur Rachid Ketrane pour son soutien, ses conseils et ses enseignements tout au long de mon cursus universitaire.

À mes ami(e)s de promotion Chimie et Physique, particulièrement : Hassiba, Asma, Kenza, Fatima et Zeynab, merci pour leur soutien.

Je remercie mes amis du laboratoire 3BS ; Naima, Yasmina, Akila, Souad, Ferial, Nawal, Mina, Sonia, Farid et Hocine. La plus belle des choses était de vous avoir connus. Votre sens du partage de connaissances et de solidarité reflète la notoriété de notre Laboratoire. Mes remerciements vont aussi aux ingénieurs du laboratoire qui ont toujours été disponibles : Sonia, Kahina et les autres.

Je remercie mon père qui a toujours cru en moi, il m'a appris le vrai sens de la vie. Je rends grâce à ma mère qui m'a constamment encouragée dans tout ce que j'entreprenais. Elle m'a appris à la fois l'amour des études et la rigueur pour y réussir.

Les mots ne pourront exprimer ma gratitude envers ma sœur Lydia, Professeur de Physique théorique à l'université A. Mira, Bejaia. Elle est mon modèle et ma fierté.

Je tiens à remercier ma sœur Mina. Son empathie, sa générosité et le fait de vouloir aider les gens et de trouver une solution à tout, font d'elle une personne exceptionnelle.

À mon cher frère Lamine qui a toujours été présent pour moi, à sa femme et à ses enfants.

À mon époux Khelifa et à mes deux enfants, Lyna et Aris qui ont été très patients durant la rédaction de ma thèse. Je vous aime.

Je remercie tous les membres de ma famille : oncles, tantes, cousins, cousines.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon oncle Hamid Addoui et à son épouse le Docteur Nadia Souami pour leur disponibilité à relire la synthèse de ma recherche.

Mes remerciements particuliers vont vers ma tante Souad qui m'a soutenu et aidé, à son époux Sadjid et à ses deux filles.

Une pensée pour mes grands-parents.

Je tiens à remercier mon beau-frère Fouad Arabqui m'a aidé à collecter mes échantillons avec enthousiasme. Son aide a été précieuse.

Je remercie mes beaux-parents, mes beaux-frères Adel et Mohammed, Nassima et Nanna.

Liste des Abréviations

AHA : *Artemisia herba-alba*

GB : Globules blancs

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion transférase

GPx : Glutathion peroxydase

NADPH : Nicotinamide AdénineDinucléotidePhosphateforme réduite

NADP⁺ : Nicotinamide AdénineDinucléotidePhosphate forme oxydée

WBCs : White blood cells

PBMCs :Periferal blood mononuclear cells

PMN :Polymorphonuclearcell

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

NOx : Oxyde d'azote

SOD : Superoxydedismutase

RNS : Radicaux libres azotés

DPPH : 2,2 diphényl 1 picrylhydrazyl

PPT : Polyphénols totaux

PMA Phorbolmyristate acétate

DHR-123 : Dihydrorhodamine-123

HPLC : High performance liquide chromatographie

O₂⁻ : Anion superoxyde

H₂O₂ : Peroxyded'hydrogene

NO : Monoxyded'azote

ONOO⁻ : Peroxynitrite

SOD : Super-oxide-dismutases

Fe²⁺ : Fer ferreux

Fe³⁺ : Fer ferrique

NO₂ : Dioxyded'azote

Cys : Cystéine

Met : Méthionine

Acy : Acide

SD : Standard deviation (écart type)

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

MW : Micro-waves

Mac : Macération

MS : Matière sèche

DW : Dry weight

sPLA2 : Phospholipase A2 sécrétoire

LOX : Lipoxygénase

COX-2 : Cyclooxygénase 2

Liste des Figures et schémas

Figure 1 : Spécimen d'herbier de la collection Trotter d'*Artemisia herba-alba* Asso

Figure 2 : Spécimen d'herbier de la composition de la partie aérienne de la plante *Artemisia herba-alba* Asso

Figure 3 : *Artemisia herba-alba*

Figure 4 : Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aigüe et chronique des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Figure 5 : Structure du glutathion (GSH)

Figure 6 : Dispositif d'un micro-onde modifié pour l'extraction par solvant assistée au micro-onde

Figure 7 : Dispositif d'extraction par macération

Figure 8 : Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits d'*Artemisia herba-alba* sur les cellules du sang total (WBCs) traitées par le PMA

Figure 9 : Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits d'*Artemisia herba-alba* sur les cellules Jurkat traitées par le PMA

Figure 10 : Pouvoir inhibiteur des espèces réactives de l'oxygène des cellules du sang total (WBCs)

Figure 11 : Pouvoir inhibiteur des espèces réactives de l'oxygène de la lignée cellulaire cancéreuse Jurkat

Figure 12 : Profile HPLC-UV de l'extrait méthanolique d'*Artemisia herba-alba* obtenu par macération

Figure 13 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par macération au méthanol, à 1 heure de post-traitements

Figure 14 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par macération au méthanol ; à 6 heures de post-traitements

Figure 15 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par macération à l'acétone ; à 1 heure de post-traitements par macération au méthanol

Figure 16 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par macération à l'acétone ; à 6 heures de post-traitements

Figure 17 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par extraction au méthanol par micro-ondes; à 1 heure de post-traitements

Figure 18 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par extraction au méthanol par micro-ondes ; à 6 heures de post-traitements

Figure 19 : Paramètres du statut redox des cellules jurkar traitées avec des extraits d'AHA obtenus par extraction à l'acétone par micro-ondes; à 1 heure de post-traitements

Figure 20 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par extraction à l'acétone l'acétone par micro-ondes; à 6 heures de post-traitements

Figure 21 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits de l'AHA obtenus par macération méthanolique ; à 24 heures de post-traitements

Figure 22 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits de macération méthanolique ; à 72 heures de post-traitements

Figure 23 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'acétone macération ; à 24 heures de post-traitements

Figure 24 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'acétone macération ; à 72 heures de post-traitements

Figure 25 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits du méthanol micro-ondes ; à 24 heures de post-traitements

Figure 26 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits du méthanol micro-ondes ; à 72 heures de post-traitements

Figure 27 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'acétone micro-ondes ; à 24 heures de post-traitements

Schéma 1 : Interrelation entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO), le stress oxydatif, l'inflammation et la physiologie cellulaire et pathologique

Sommaire

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des Figures et schémas

Liste des tableaux

Introduction 1

Recherche bibliographique

Chapitre I : <i>Artemisia herba-alba</i> , une plante à usage phyto-thérapeutique	4
I.1. Description de la plante <i>Artemisia herba-alba</i>	6
I.2. Taxonomie	6
I.3. Répartition géographique et physionomie	6
I.4. Usage phyto-thérapeutique	9
I.5. Composition chimique	9
Chapitre II: Stress oxydatif et inflammation	17
II.1. Stress Oxydatif	18
II.1.1. Méthodologie d'évaluation du stress oxydant	20
II.2. Radicaux libres	20
II.3. Production des radicaux libres	22
II.3.1. Voies physiques	22
II.3.2. Voies chimiques	22
II.3.3. Voies électrochimiques	23
II.4. Radicaux libres en biologie	23
II.4.1. Radicaux libres azotés (RNS)	24
II.4.2. Radicaux libres soufrés	24
II.4.3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	24

II.5. Antioxydants	26
II.5.1. Antioxydants non-enzymatiques	26
II.5.1.1. Glutathion	26
II.5.1.1.1. Structure et fonction du glutathion	26
II.5.1.1.2. Glutathion et réponse anti-oxydante	27
II.5.2. Antioxydants enzymatiques	28
II.5.2.1. Super-oxyde-dismutase (SOD).....	28
II.5.2.2. Glutathion peroxydase (GPx)	28
II.5.2.3. Glutathion S-transferase (GST)	29
II.5.2.4. Glutathion réductase (GR)	29
II.5.2.5. Thiols.....	29
II.5.3. Antioxydants exogènes ou naturels	30
II.5.4. Autres antioxydants	32
II.6. Inflammation	33
II.6.1. Inflammation et Stress oxydant	33
II.6.2. Anti-inflammatoires d'origine végétale	34

Matériel et méthode

Chapitre III : Méthode expérimentale.....	35
III.1. Préparation du matériel végétal.....	36
III.2. Préparation des extraits de la plante <i>Artemisia herba-alba</i>	36
III.2.1. Extraction par solvant assistée au micro-onde.....	36
III.2.2. Extraction par macération.....	37
III.3. Dosage des polyphénols totaux PPT.....	38
III.4. Teste de piégeage du radical libre DPPH.....	39
III.5. Isolement des globules blancs mononuclées (WBC) et culture cellulaire---	40
III.6. Quantification de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)....	40
II.7. Mesure des activités enzymatiques	41
III.8. Glutathion total et glutathion protéique.....	42
III.9. Mesure de la viabilité cellulaire.....	42
III.10. Caractérisation par HPLC-UV des constituants chimiques de l'extrait d' <i>Artemisia herba-alba</i> obtenu par macération méthanolique	43

ChapitreIV: Résultatset discussion	44
IV.1. Polyphenols totaux (PPT) et capacité de piégeage du radical DPPH des extraits d' <i>Artemisia Herba-alba</i>	43
IV.2. Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits d' <i>Artemisia herba-alba</i> contre les cellules cancéreusesJurkat et cellules du sang total saines (WBCs)	46
IV.3. Extraits d' <i>Artemisia herba-alba</i> , inhibiteurs de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	48
IV.4. Mise en évidence de l'effet anti-inflammatoire des extraits d' <i>Artemisia herba-alba</i> via la mobilisation du métabolisme du glutathion	52
IV.4.1. Caractérisation chimique des composés présents dans les extraits éthanoliques de l'AHA.....	52
IV.4.2. Caractérisation de la réponse cellulaire via la mobilisation du métabolisme du glutathion	57
Conclusion générale	73
Références bibliographiques	75
Annexes	86

Introduction

Les populations autochtones du bassin méditerranéen utilisent plusieurs plantes endémiques pour soigner d'une manière empirique des maladies qui les touchent. Notamment le cas d'*Artemisia herba-alba* Asso, qui est une plante médicinale endémique en Afrique du nord, utilisée depuis l'antiquité pour le traitement des troubles pathologiques liés aux infections bactériennes et fongiques, mais pas uniquement.

Par ailleurs la consommation régulière de certaines plantes médicinales est souvent associée à un faible risque de développer des maladies chroniques, ce qui suggère des effets prophylactiques et protecteurs contre le vieillissement et les défaillances d'organes. Les études épidémiologiques sur les maladies cardio-vasculaires et sur le cancer montrent des corrélations souvent négatives entre le risque de survenue de ces maladies et la concentration des antioxydants dans les tissus humains (Petrovska, 2012). La plupart des phyto-constituants bioactifs assurent la médiation des mécanismes de protection par des voies biomoléculaires spécifiques (Craig, 1999). Cependant, l'impact des plantes médicinales a été déterminé empiriquement et leurs mécanismes d'action restent très peu connus.

Le genre *Artemisia* L. englobe de petites herbes et arbustes appartenant à l'importante famille des astéracées et existe dans toute la moitié nord du monde (Quezel, P. and Santa, S., 1962). Le genre *Artemisia* comprend plus de 500 espèces présentant une énorme variabilité phytochimique (Amri et al., 2013). Un grand nombre d'espèces d'*Artemisia* produisent des huiles essentielles utilisées en médecine traditionnelle (Aziz et al., 2012), en cosmétique et en industrie pharmaceutique, à valeur économique rentable (Younsi et al., 2016).

La plante *Artemisia herba-alba* est largement répandue dans la région méditerranéenne, poussant dans les régions arides à semi-arides. On la trouve également dans le nord-ouest de l'Himalaya et en Inde. La plante *Artemisia herba-alba* est employée sous différentes formes pour traiter des maladies basées sur des expériences empiriques et des connaissances locales transmises (Tahraoui et al., 2007). L'huile essentielle extraite par distillation des feuilles séchées et des fines branches de la plante est largement utilisée en médecine traditionnelle, pour traiter la bronchite et les infections cutanées locales. De plus, les infusions d'*Artemisia herba-alba* sont utilisées pour traiter la toux, les douleurs intestinales, le diabète et les inflammations (Khlifi et al., 2013). La composition chimique d'*Artemisia herba-alba* peut varier. Des enrichissements pour certains composés et molécules bioactives

pourraient être observés, principalement avec des molécules volatiles. Parmi les constituants volatils dominants figurent les monoterpènes, y compris deux formes diastéréoisomères de thuyone, 1-8 cinéole et camphre (Mohsen and Ali, 2009; Younsi et al., 2018). Certaines recherches ont montré que la constitution des composés dominants et la quantité des polyphénols, considérés comme des antioxydants réduisent le niveau d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans l'organisme vivant. Ces travaux indiquent des enrichissements élevés en polyphénols tels que mesurés par différents dosages (Said et al., 2016; Younsi et al., 2018). Pour caractériser expérimentalement les propriétés biologiques de la plante *Artemisia herba-alba* (AHA), les chercheurs se sont concentrés sur les actions antibactériennes et antifongiques (Abu-Darwish et al., 2015; Saleh et al., 2006). D'autres ont évalué les propriétés anti-inflammatoires d'extraits d'huile et ont démontré une réduction des productions de cytokines (Messaoudene et al., 2011). Cependant, on ne sait pas si les propriétés bénéfiques des extraits d'AHA sont liées uniquement à la quantité de polyphénols pour le potentiel de piégeage directement tel qu'un effet *in vitro*, ou par une modulation des voies biomoléculaires cellulaires.

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. Le statut redox des cellules est maintenu par de nombreuses voies métaboliques parmi lesquelles la voie du glutathion. Le glutathion (GSH) est un antioxydant intracellulaire omniprésent composé par la combinaison de trois peptides (gamma-glutamylcystéinyglycine) responsable critique de l'homéostasie cellulaire (Ostergaard et al. 2004). Le GSH est synthétisé par l'enzyme gamma-glutamylcystéine ligase et maintenu par la glutathion réductase grâce à une régénération du glutathion oxydé (GSSG). Le glutathion est aussi un cofacteur de multiples enzymes détoxifiantes telles que la glutathion transférase (GST) et les glutathion peroxydases (GPx). Les deux enzymes transfèrent le fragment GSH pour bloquer les groupes chimiques réactifs. Par conséquent, il est bien établi que le glutathion est le principal tampon redox dans la cellule. La modulation externe du niveau de GSH est devenue récemment l'une des stratégies chimio-préventives pour réduire les dommages causés par les ERO et le stress oxydatif.

Le but de notre étude est l'évaluation d'un nouveau procédé d'extraction utilisant la méthode d'extraction assistée par micro-ondes et la caractérisation *in vitro* et *in vivo* des capacités anti-oxydantes et antiprolifératives de l'AHA. Notre travail décrit un nouveau mécanisme biomoléculaire par lequel les extraits d'AHA peuvent améliorer les capacités anti-

oxydantes des cellules *via* une reconstitution du statut redox. L'induction endogène du glutathion par des extraits d'AHA reste l'effet physiologique le plus pertinent, non délétère pour les cellules normales mais en revanche peut détruire les cellules cancéreuses.

Notre thèse débute par une introduction et comprend quatre chapitres dont le premier est une description générale de la plante *Artemisia herba-alba*, de sa description botanique à sa composition chimique. Nous avons, aussi, mis en évidence l'importance de cette plante dans le traitement de multiples maladies.

Le second chapitre traite le stress oxydant où nous parlerons des radicaux libres, des espèces réactives de l'oxygène ainsi que des antioxydants et nous donnerons un bref aperçu de l'inflammation.

Le troisième chapitre sera consacré à la méthodologie expérimentale. Quant au quatrième chapitre, il comprend tous les résultats obtenus ainsi que leurs discussions.

Cette présente thèse sera finalisée par une conclusion générale résumant les résultats importants pouvant offrir des perspectives pour notre travail.

L'article intitulé « Anti-inflammatory and prolonged protective effects of *Artemisia herba-alba* extracts *via* glutathione metabolism reinforcement » qui m'a permis de soutenir ma thèse de doctorat est joint en Annexe à cette thèse.

Recherche bibliographique

Chapitre I

Artemisia herba-alba Asso

**Une plante à usage
phytothérapeutique**

Le règne végétal constitue une source inépuisable de nouvelles molécules utilisables directement comme principe actif ou pouvant servir comme précurseurs pour le développement de molécules thérapeutiques. Le mot "phytothérapie" se compose étymologiquement de deux racines grecques : *phuton* et *therapeia* qui signifient respectivement "plante" et "traitement". La phytothérapie se base sur l'usage de la plante entière ou des formes galéniques dérivées de plantes obtenues par des procédés d'extraction et d'isolation de principes actifs afin de faciliter l'usage et d'optimiser l'effet de la molécule bioactive. Sont considérées comme plantes médicinales toutes plantes contenant une ou plusieurs substances pouvant être utilisées à des fins curatives ou qui sont utilisées comme base dans la synthèse de traitements utiles. La complexité structurale et moléculaire des plantes ouvre un champ de recherche dans plusieurs domaines ; médical, agro-alimentaire et agricole.

En effet, les plantes se composent de métabolites primaires et secondaires. Un métabolite primaire est un composé chimique qui est directement impliqué dans la croissance, le développement et la reproduction normale d'un organisme ou d'une cellule végétale. Le métabolite généralement a une fonction physiologique dans cet organisme, c'est-à-dire une fonction intrinsèque centrale bien précise. Il est également désigné par métabolite central, qui prend même le sens plus restrictif de métabolite présent dans tous les organismes ou cellules en croissance autonome. Ces macromolécules sont nécessaires et vitales, tels que (Calatayud et al., 2013) :

- les acides aminés, source primaire pour la synthèse des protéines ;
- les glucides, source d'énergie et paroi cellulaire ;
- les lipides, source d'énergie et membranes cellulaires.

Inversement, un métabolite secondaire n'est pas directement impliqué dans les processus physiologiques fondamentaux de l'organisme, mais possède une fonction écologique importante, c'est-à-dire une fonction relationnelle. Chez les plantes, les métabolites secondaires sont importants à la survie et à la prolifération de l'espèce. Ils jouent un rôle important dans la transmission des signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à l'environnement, de moyens de défense contre les herbivores, les agents pathogènes ou les compétiteurs (Bennett and Wallsgrove, 1994; Bouharmont and Évrard, 2002). D'autres protègent la plante des radiations solaires ou encore facilitent la dispersion du pollen et des graines, parmi elles (Hartmann, 2007) :

- Les terpénoïdes ;

- Les stéroïdes ;
- Les Alcaloïdes et composés azotés.
- Les composés phénoliques.

La plante *Artemisia herba-alba* est très utilisée en médecine traditionnelle et moderne, cependant les mécanismes d'actions intracellulaires sont très peu abordés, pourtant, elle attire l'intérêt des chercheurs en raison de ses multiples usages, par les différents peuples qui cultivent cette plante, ainsi que ses multiples effets thérapeutiques prouvés empiriquement.

I.1 Description de la plante *Artemisia herba-alba*

Artemisia herba-alba appelée Chih en arabe Algérien, Arzag en berbère ou Armoise herbe blanche en Français est une herbe vivace de couleur vert-argenté, mesurant de 20 à 40 cm de hauteur (Quezel, P. and Santa, S., 1962), classée pour la première fois par le botaniste espagnol Ignacio Jordan Claudio de Asso qu'il la répertorie en 1779 en tant qu'*Artemisia herba-alba* Asso.

I.2. Taxonomie

La plante appartient :

- Au règne Plantae Haeckel., 1866
- Ordre Asterales Link, 1829
- famille des Asteraceae Bercht. & J.Presl., 1820
- Au genre *Artemisia* L., 1753
- Et à l'espèce : *Artemisia herba-alba* Asso., 1779

I.3. Répartition géographique et physionomie

L'*Artemisia herba-alba* est une plante spontanée répandue en Afrique du nord, dans la péninsule ibérique ainsi qu'au moyen orient. Ses caractéristiques morphologiques et physiologiques font d'elle une espèce bien adaptée aux conditions climatiques arides. Elle se présente sous forme de buissons blancs, laineux et espacés (Kappen et al., 1972).

Le dimorphisme saisonnier de son feuillage lui permet de réduire la surface transpirante et d'éviter ainsi les pertes d'eau. Grâce à son système racinaire très dense à la surface, l'*Artemisia herba-alba* est capable de valoriser toute humidité superficielle occasionnée par

des petites pluies. Cette espèce est également capable d'exploiter l'humidité du sol jusqu'à 50 cm de profondeur et peut profiter des fractures de la croûte pour atteindre les poches d'humidité notamment, dans les sols à encroûtement calcaire, la tige principale se divise en « branches » physiologiquement indépendantes les unes des autres et susceptibles de mourir sans entraîner la mort de la plante entière. La floraison de cette espèce débute le plus souvent en juin mais les fleurs se développent essentiellement à la fin de l'été. Lors des années pluvieuses et dans les sols qui lui conviennent, l'*Artemisia herba-alba* présente une forte production de graines et un pouvoir de régénération élevé (Schulze et al., 1980, 1973).



Figure 1 : Spécimen d'herbier de la collection Trotter d'*Artemisia herba-alba* Asso (De Natale and Pollio, 2012).

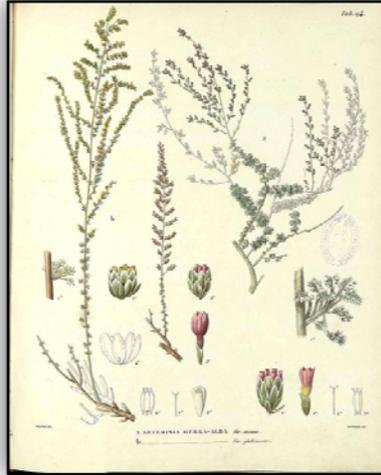


Figure 2 :Spécimen d'herbier de la composition de la partie aérienne de la plante *Artemisia herba-alba* Asso(Boissier, P.E ; J.C. Heyland, 1839).



Figure 3 :*Artemisia herba-alba*

En Afrique du nord, l'*Artemisia herba-alba* se rencontre à l'état spontané, il n'est pas rare de trouver des zones de plusieurs dizaines de kilomètres de rayon où seule l'armoise blanche règne dans un paysage quasi-désertique. En Algérie, l'*Artemisia herba-alba*, couvre près de six millions d'hectares dans les steppes. Au Maroc, on attache beaucoup d'importance à cette plante qui constitue un excellent moyen naturel de lutte contre l'érosion et la désertification (Boudalia et al., 2019).

I.4. Usage phytothérapeutique

La plante *Artemisia herba-alba* est utilisée pour traiter diverses maladies allant de simples crampes abdominales aux maladies plus complexes tels que le diabète et les maladies neurologiques et inflammatoires. Dans cette perspective, beaucoup de chercheurs se sont penchés sur cette plante afin de mettre en évidence ses effets thérapeutiques pertinents.

L'*Artemisia herba-alba* est largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter de nombreux troubles pathologiques, ce qui a amené plusieurs chercheurs à l'étudier.

Les activités antihyperglycémiques (al-Khazraji et al., 1993; al-Shamaony et al., 1994; Marrif et al., 1995), antimicrobiennes (Imelouane et al., 2010), anti-oxydantes (Abid et al., 2007; Khlifi et al., 2013), antispasmodiques (Cortés et al., 2006; Sarri et al., 2014; Yashphe et al., 1987), antivenimeuses, nématocides (D'Addabbo and Avato, 2021), antileishmaniennes (Boudjelal et al., 2013), neurologiques et inhibitrices de la résistance aux antibiotiques de cette plante ont été précédemment rapportées (Mohamed et al., 2010). De plus, l'extrait aqueux augmente significativement le temps de transit gastro-intestinal et le temps de réaction aux stimuli thermiques (Marrif et al., 1995). En outre, les espèces de ce genre sont largement utilisées dans les industries pharmaceutique, cosmétique et alimentaire. L'*Artemisia caerulescens* a des actions analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (Morán et al., 1989). L'*Artemisia capillaris* dilate les vaisseaux sanguins (Yamahara et al., 1989). L'artémisinine (lactone sesquiterpénique), principe actif, extrait de l'*Artemisia L.* combinée à un composé tel que la sulfadoxine-pyriméthamine, l'amodiaquine ou la méfloquine est utilisée pour lutter contre le paludisme (Yang et al., 1982). Les racines de l'*Artemisia herba-alba* en décoction sont recommandées contre les désordres neurologiques et utilisées pour le traitement des troubles psychiatriques (Alzweiri et al., 2011; Salah and Jäger, 2005).

I.5. Composition chimique

Au Maghreb, l'*Artemisia herba-alba* constitue un fourrage particulièrement intéressant. En effet, la plante présente un taux de cellulose beaucoup moins élevé malgré que son aspect extérieur indiquant l'inverse (17 à 33%). La matière sèche (MS) apporte entre 6 et 11% de matière protéique brute dont 72% est constituée d'acides aminés. Le taux de β -carotène varie entre 1,3 et 7 mg/kg selon les saisons. La valeur énergétique de l'AHA est très faible en hiver (0,2 à 0,4 UF/kg MS) et augmente rapidement au printemps (0,92 UF/kg MS) pour diminuer à nouveau en été (0,6 UF/kg MS). En automne, les pluies de septembre provoquent une

nouvelle période de croissance et la valeur énergétique augmente de nouveau (0,8 UF/kg MS). Les plantes de la famille des Astéracées, auxquelles appartient l'*Artemisia herba-alba*, ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques par intérêt économique surtout pour leurs huiles essentielles et plusieurs articles se sont penchés vers la détermination de la composition chimique de la plante *Artemisia herba-alba* afin de mieux comprendre le mécanisme fonctionnel et ainsi trouver le composé majoritaire qui peut induire une réponse ciblée de l'organisme. Les composés uniques bioactifs enrichis sont principalement des molécules volatiles. Parmi les constituants volatils dominants, on trouve les monoterpènes, dont deux formes diastéréomères (Younsi et al., 2018). Cinquante composants ont été identifiés dans les huiles d'*Artemisia herba-alba*, les monoterpènes contenant de l'oxygène étant dominants dans tous les cas (72-80%). Le camphre (17-33%), l' α -thujone (7-28%) et la chrysanthénone (4-19%) étaient les principaux composants des huiles. Malgré la similarité des composants principaux, trois types d'huiles ont pu être définis, (a) α -thujone : camphre, (b) camphre : chrysanthénone et (c) α -thujone : camphre : chrysanthénone (Belhattab et al., 2014). Comme cela a été également rapporté par (Cheraif et al., 2020) que le composé majoritaire est la α -thujone (28.1%) puis vient après le camphre (22.8%) et le 1,8-cineole (8.2%) (Cheraif et al., 2020). Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés et identifiés dont les plus importants sont les lactones sesquiterpéniques tels que les eudesmanolides et les germacranolides.

Les lactones sesquiterpéniques sont parmi les produits naturels les plus importants trouvés dans les espèces d'*Artemisia* dont plusieurs types structurels ont été trouvés dans les parties aériennes, largement responsables de l'importance de ces plantes en médecine et en pharmacie. Les eudesmanolides suivis des germacranolides semblent être les types de lactones les plus abondants trouvés dans cette espèce.

Au cours de l'étude de l'espèce *Artemisia herba-alba* qui pousse en Israël (désert du Néguev et de Judée), cinq chémotypes différents ont été identifiés sur la base des différences dans la constitution de leurs lactones sesquiterpéniques (Feuerstein et al., 1986; Segal et al., 1987) (1-10). En Espagne, certaines études phytochimiques ont porté sur les lactones sesquiterpéniques de l'AHA collectées dans différents endroits géographiques (11-47).

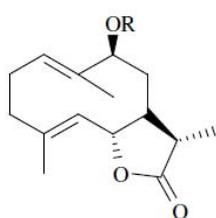
De nombreuses études ont été faites (Mohamed et al., 2010) sur l'espèce *Artemisia herba-alba* qui pousse en Egypte afin de déterminer ses différents constituants chimiques. La plupart des études ont porté sur les lactones sesquiterpéniques et il a été rapporté que toutes les lactones isolées (48-57) sont différentes de celles trouvées précédemment chez l'*Artemisia herba-alba* cultivée en Israël. Quelques articles ont étudié les constituants chimiques de

l'espèce marocaine (58-64) et algérienne (65-66). Ce qui prouve que ce genre est riche en sesquiterpènes.

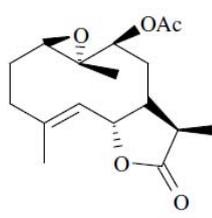
Les flavonoïdes détectés dans l'AHA montrent aussi une diversité structurale allant des flavonoïdes communs (flavones glycosides et flavonols) jusqu'aux flavonoïdes méthylés qui sont très inhabituels. Les flavonoïdes glycosides comprennent les *O-glycosides* tels que la quercitine-3-glucoside et des flavones *C-glycosides* qui sont rares dans le genre *Artemisia*, ainsi que dans l'ensemble des Astéracée (Salah and Jäger, 2005). En plus des sesquiterpènes lactones et des flavonoïdes, l'analyse phytochimique a montré que la composition des huiles essentielles de l'AHA est riche en mono terpènes, tri terpènes pentacycliques, santonines, coumarines et tanins (Mohamed et al., 2010). L'examen des parties aériennes d'AHA collectées dans des herboristeries libanaises a permis d'isoler deux flavonoïdes : l'hispiduline et le cirsilineol. Une nouvelle flavone, la 5,4'-dihydroxy-6,7,3'-triméthoxyflavone, a été isolée de l'extrait non glycosidique des parties aériennes de AHA.

Les compositions chimiques des constituants identifiés de la plante *Artemisia herba-alba*, sont résumées ci-dessous (Mohamed et al., 2010):

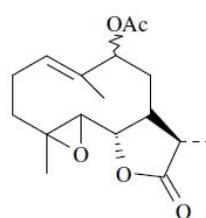
Lactones sésquitérpéniques de l'AHA cultivée en Egypte, Maroc, Espagne et Algérie :



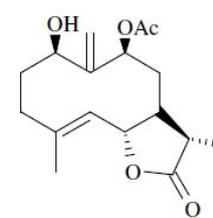
R= COMe, Herbolide A (1)
R=H, Deacetylherbolide A (2)



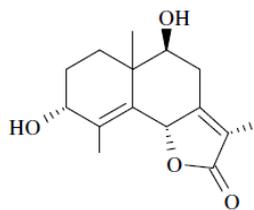
Herbolide B (3)



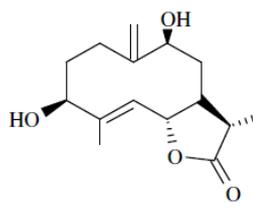
Herbolide C (4)



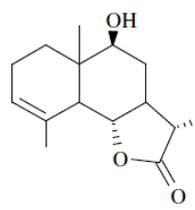
Herbolide D (5)



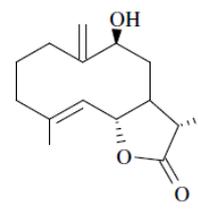
Herbolide E (6)



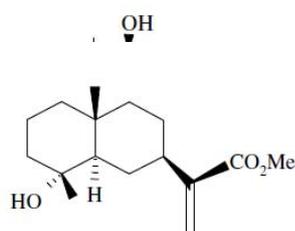
Herbolide F (7)



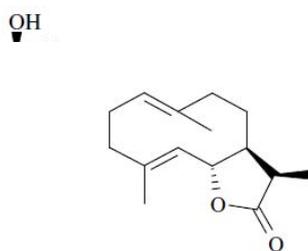
Herbolide G (8)



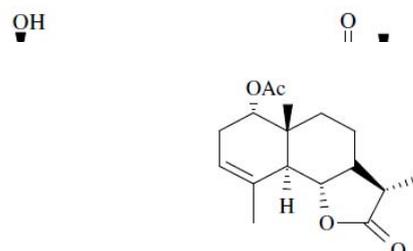
Herbolide H (9)



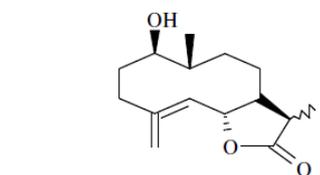
Vachanic acid (14)



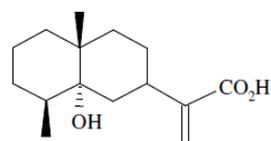
α ,13-Dihydrocostunolide (15)



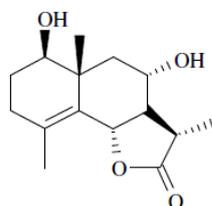
11 β ,13-Di-Hydrodouglanin acetate (16)



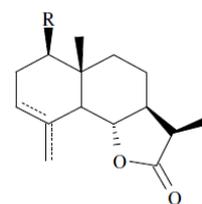
$\Delta^{4(15)}$ (11 α H), 11 α ,13-Dihydroreynosin (17)
 Δ^4 (11 α H), 11-Epiartessin (18)



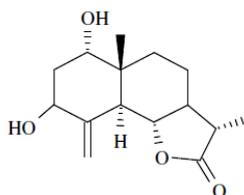
α -Hydroxy-7 α -eudesma-4(15),11(13)-dien-12-oic acid (19)



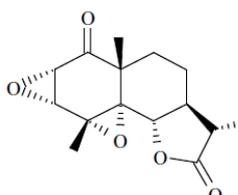
1 β ,8 α -Dihydroxyeudesm-4-en-6 β ,7 α ,11 β H-12,6-olide (20)



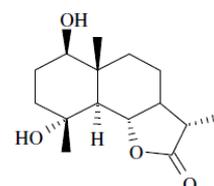
R = OH, Δ^3 ,5 α H, 11 α ,13-Dihydrosantamarin (21)
 R = H, $\Delta^{4,5}$, 5 α H,13-Dihydro- β -cyclocostunolide (22)



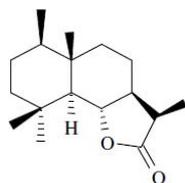
3-Epi-erivanin (23)



1-Oxo-2 α ,3 α ,4 α ,5 α -diepoxyeudesman-11 β H-12,6 α -olide (24)



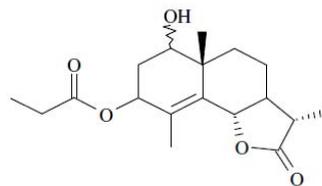
1 β -Hydroxy colartin (25)



R1 = H, R2 = Me, R3 = OH, 11-Epicolartin (26)

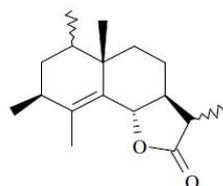
R1 = OH, R2 = Me, R3 = OH, 1 β -Hydroxy-11-epicolartin (27)

R1 = OH, R2 = Me, R3 = Me, 1 β -Hydroxy-4,11-diepicolartin (28)



1 β -OH, 1 β -Hydroxy-3 β -propionyloxy-6 β ,7 α ,11 β H-eudesm-4-en-12,6-olide (29)

1 α -OH, 1 α -Hydroxy-3 β -propionyloxy-6 β ,7 α ,11 β H-eudesm-4-en-12,6-olide (30)

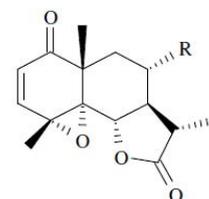


R1 = β -OH, R2 = Ac (11 α H), 11-Epitorrentin (31)

R1 = α -OH, R2 = Ac (11 α H), 1,11-Diepitorrentin (32)

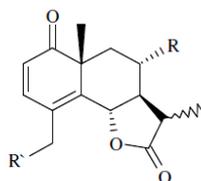
R1 = β -OH, R2 = H (11 β H), Deacetyltorrentin (33)

R1 = β OH, R2 = H (11 α H), 11-Epi-deacetyltorrentin (34)



R = H, 1-Oxo-4 α ,5 α -Epoxyeudesm-2-en-11 β H-12,6 α -olide (35)

R = OH, 1-Oxo-8 α -Hydroxy-4 α ,5 α -epoxyeudesm-2-en-11 β H-12,6 α -olide (36)



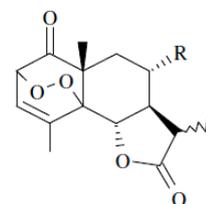
R = R' = H (11 α H), 1-Oxoeudesma-2,4-dien-11 α H-12,6 α -olide (37)

R = R' = H (11 β H), 1-Oxoeudesma-2,4-dien-11 β H-12,6 α -olide (38)

R = OH, R' = H (11 α H), 1-Oxo-8 α -hydroxyeudesma-2,4-dien-11 α H-12,6 α -olide (39)

R = OH, R' = H (11 β H), 1-Oxo-8 α -hydroxyeudesma-2,4-dien-11 β H-12,6 α -olide (40)

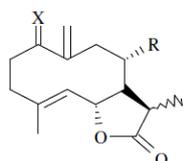
R = H, R' = OH (11 β H), 1-Oxo-15-hydroxyeudesma-2,4-dien-11 β H-12,6 α -olide (41)



R = H, (11 α H), 1-Oxo-2 α ,5 α -peroxyeudesm-3-en-11 α H-12,6 α -olide (42)

R = H (11 β H), 1-Oxo-2 α ,5 α -peroxyeudesm-3-en-11 β H-12,6 α -olide (43)

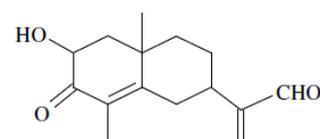
R = OH (11 β H), 1-Oxo-8 α -Hydroxy-2 α ,5 α -peroxyeudesm-3-en-11 β H-12,6 α -olide (44)



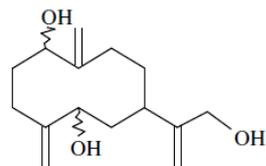
R = H, X = O (11 α H), 1-Oxogermacra-4,10(14)-dien-6 β ,7 α ,11 α H-12,6-olide (45)

R = OH, X = H, β OH (11 α H), 11-Epishonachalin A (46)

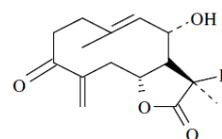
R = OH, X = H, β OOH (11 β H), 1 β -Hydroperoxy-8 α -hydroxygermacra-4,10(14)-dien-6 β ,7 α ,11 β H-12,6-olide (47)



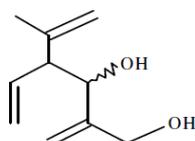
2 β -Hydroxy-13-oxo- α -cyperene (48)



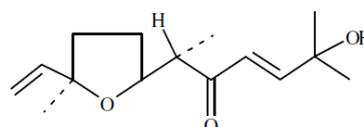
1 β ,5,12-Trihydroxygermacra-1(10), 4(15), 11(13)-triene (**49**)



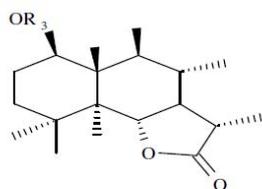
3 β -Hydroxy-8-oxo-6 β H,7 α H,11 β H-germacran-4(14),9(10)-dien-6,12-olide (**50**)



7-Hydroxy-5,6-dehydro-4,5-dihydrolyratrol (**51**)

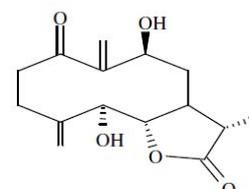


2,6,10-Trimethyl-Cis-7,10-oxido-dodeca-3E,11-dien-2-ol-5-one (**52**)

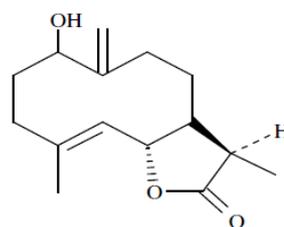


R1 = H, R2 = OH, R3 = Ac, R4 = H, R5 = H,
5a-Hydroxy-11,13-dihydroreynosin acetate (**53**)

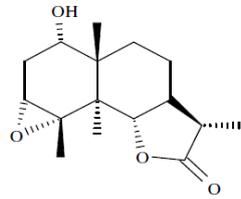
R1 = R2 = R3 = R4 = H, R5 = OH,
9b-Hydroxy-11,13-dihydroreynosin (**54**)



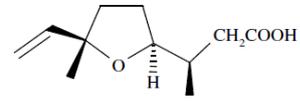
5 β ,9 β -Dihydroxy-1-Oxo-germacra-1(10),4(15)-dien-12,6-olide (**55**)
[43]



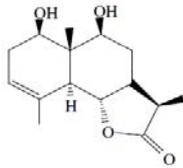
1 β -Hydroxy-6 β H,7 α H,11 α H-germacran-4(5)-10(15)-dien-6,12-olide (**56**)



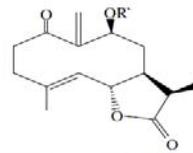
Herbalbin (58)



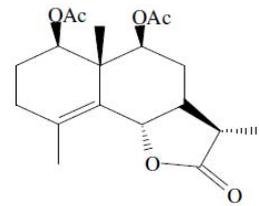
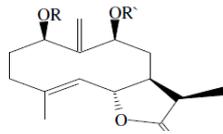
(3 R,4S,7R)-3,7-Dimethyl-4,7-epoxynon-8-enoic acid (59)



1β,9β-Dihydroxyeudesm-3-en-5α,6β,11βH-12,6-olide (60)
[44]

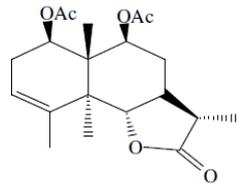


R = H, 1-Oxo-9β-Hydroxygermacra-4,10(14)-dien-6β,11βH-12,6-olide (61)
R = Ac, 1-Oxo-9β-Acetoxygermacra-4,10(14)-dien-6β,11βH-12,6-olide (62)



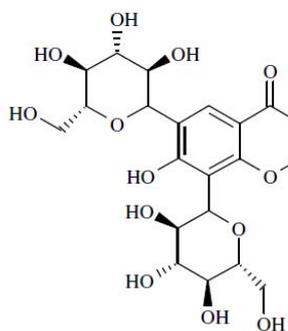
1β,9β-Diacetoxyeudesm-4-en-6β,11βH-12,6-olide (65)

R
R
~

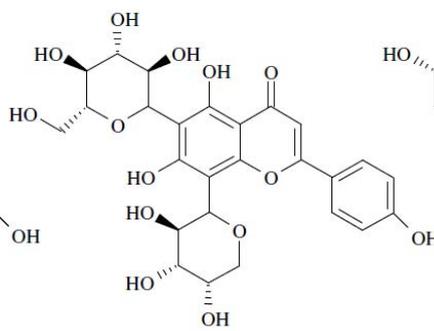


1β,9β-Diacetoxyeudesm-3-en-6β,11βH-12,6-olide (66)

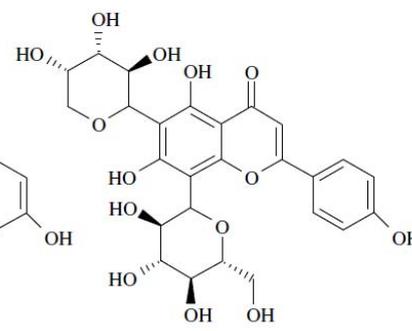
Les Flavonoïdes de l'AHA :



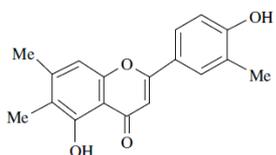
Vicenin-2



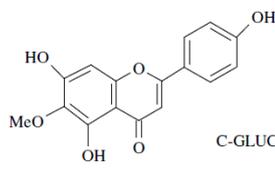
Schaftoside



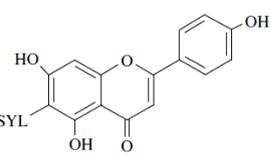
Isoschaftoside



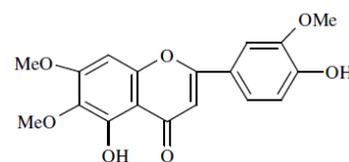
Cirsilineol



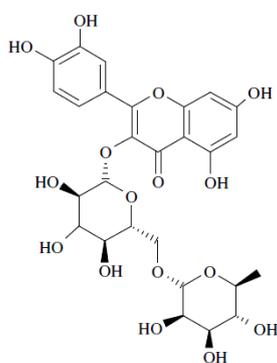
Hispidulin



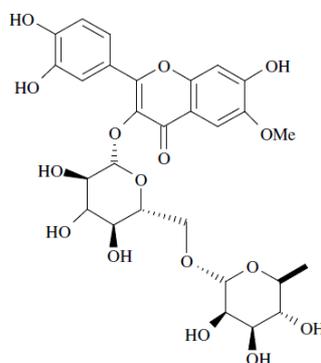
Isovitexin



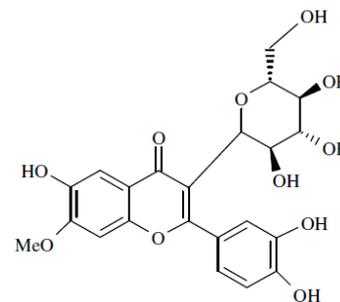
5',4-Dihydroxy-6,7,3'-
triméthoxyflavone



Quercetin-3-rutinoside



Pultetin 3-rutinoside



Pultetin 3-glucoside

Chapitre II

Stress oxydatif et inflammation

La cellule possède un système antioxydant complexe et contrôle d'une manière adéquate les réactions d'oxydoréduction nécessaires à son bon fonctionnement, comme celles impliquées dans la production de l'énergie cellulaire. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des composés chimiques omniprésents dans les parois cellulaires et mitochondries où ils sont produits en quantité contrôlée pour les besoins cellulaires, ils contribuent essentiellement à la production d'énergie et ne sont donc pas systématiquement nocifs pour la cellule car d'autre part celle-ci produit des antioxydants enzymatiques qui assurent un certain équilibre redox. Bien que les réactions d'oxydation soient nécessaires à la vie, elles peuvent aussi produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaînes destructrices. Les antioxydants sont capables de stopper ces réactions en chaînes en réagissant avec les radicaux libres, inhibant ainsi leurs propagations et ainsi que leurs actions destructrices. Une déficience ou une absence de production d'enzymes anti-oxydantes ou un excès de la production des ERO entraîne un déséquilibre d'oxydoréduction qui engendre un stress cellulaire que l'on appelle "stress oxydatif".

Chaque organe ou tissu peut devenir la cible des dommages oxydatifs, ce qui peut générer l'augmentation de risques de développer des maladies chroniques pouvant toucher des organes comme :

- Peau : dermatose, psoriasis ;
- Cerveau : Parkinson, Alzheimer ;
- Poumons : Asthme, détresse respiratoire aigüe ;
- Vaisseaux sanguins : Athérosclérose ;
- Yeux : cataracte et dégénérescence maculaire.

Les dommages oxydatifs sont un facteur déclenchant ou participant au déclenchement de ces pathologies. Il est donc nécessaire et logique d'envisager les effets bénéfiques d'une modulation positive du statut redox par un renforcement du potentiel antioxydant cellulaire *via* une augmentation des capacités tampon. Ceci passe inévitablement par une modulation du statut des thiols cellulaires *via* le glutathion (GSH).

II.1. Stress Oxydatif

Le stress oxydatif peut se définir comme étant un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les capacités de détoxification de la cellule, ce qui perturbe les capacités cellulaires à réduire les intermédiaires réactifs ou/et à réparer les dommages aux systèmes et composés cellulaires causés par les ERO (Bloomer et al., 2008 ;

Browne et al., 2008 ; Powers et al., 2010). En 1991, le chercheur Helmut Sies a défini la notion de stress oxydant comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre une agression des espèces réactives de l'oxygène, suite à un déséquilibre lié, soit à une production accrue des ERO, soit à une diminution de la capacité de défenses anti-oxydantes, par exemple dans le cas d'une inflammation aigue ou chronique (**Figure 4**).

L'équilibre redox intracellulaire (l'équilibre dynamique entre les espèces oxydantes et réductrices au sein des cellules) est étroitement couplé au tripeptide antioxydant, le GSH. Les niveaux intracellulaires du GSH sont fortement régulés par des enzymes pour maintenir un environnement réducteur tampon. Certaines de ces espèces réactives de l'oxygène sont constamment produites à de faibles niveaux en tant que sous-produits de réactions métaboliques normales et sont contrôlées par les enzymes qui maintiennent l'équilibre redox intracellulaire. Lorsque l'équilibre redox est perturbé, ces espèces modérément réactives peuvent interagir avec les métaux de transition ou d'autres composants du cycle redox pour produire des espèces oxygénées hautement réactives pouvant causer des dommages importants aux lipides, aux protéines, à l'ADN et aux organites cellulaires et causer un déséquilibre métabolique(Sies, 1997). Le stress est une réaction normale de l'organisme, il se produit dans le but d'atteindre un état d'équilibre redox intracellulaire, il devient pathologique lorsque il est chronique. (**Figure 4**).

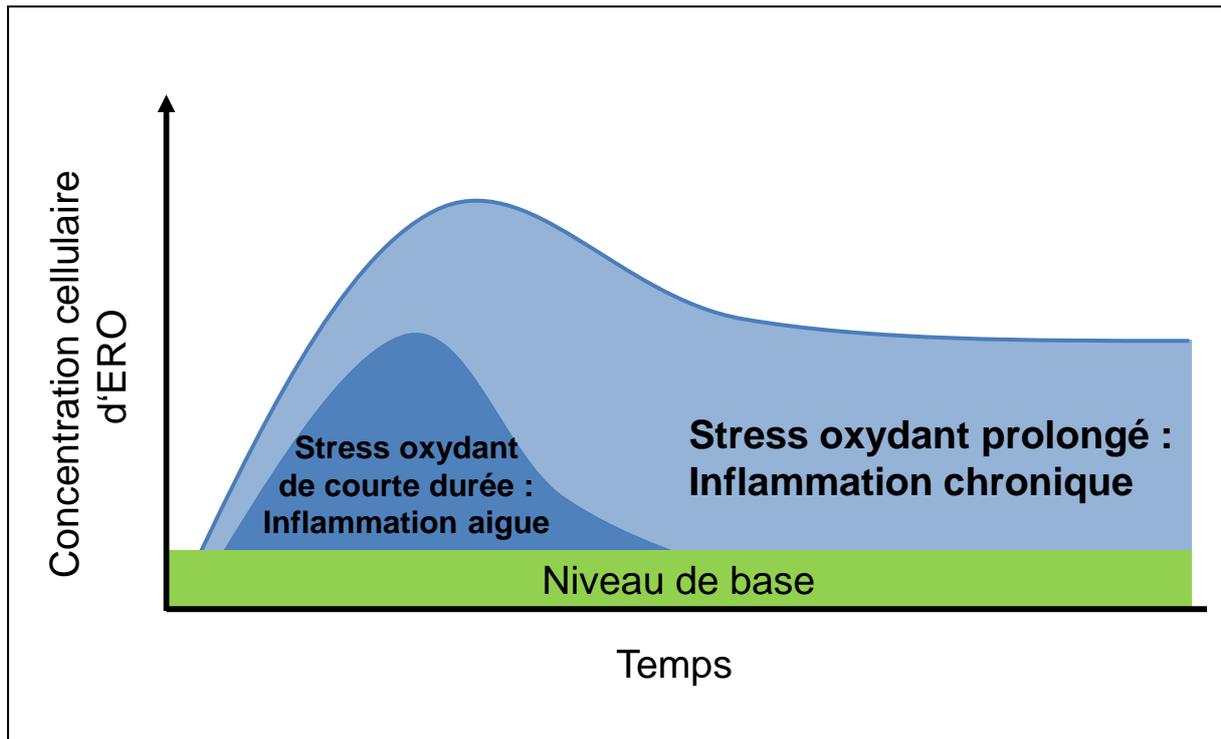


Figure. 4 : Modification de l'équilibre redox cellulaire par la production aigue et chronique des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

II.1.1.Méthodologie d'évaluation du stress oxydant

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) réagissent avec les protéines, les lipides ou les acides nucléiques comme l'ADN. Les changements induits par les ERO sur le système antioxydant sont un fort indice d'une variation du statut redox. La mise en évidence de dérivés d'oxydation de ces différents substrats permet d'estimer les dommages oxydatifs et ce, sur les deux plans ; physiologique et pathologique.

II.2.Radicaux libres

Dans la plupart des molécules organiques, les atomes voisins sont liés les uns aux autres par des liaisons covalentes, c'est-à-dire fondées sur l'appariement naturel des électrons de vecteurs magnétiques ou « spin » opposés. Lors d'une irradiation, de l'exposition à une source d'énergie lumineuse ou thermique d'intensité suffisante, ou de réactions chimiques

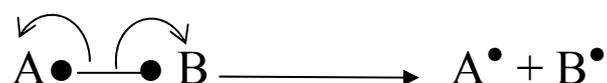
d'oxydoréduction, le couple électronique peut être rompu. La molécule ou l'atome se trouve de ce fait, porter un ou plusieurs électrons « célibataires » sur son orbitale externe et est désigné sous le terme de « radical libre ». La tendance naturelle des électrons non appariés à interagir avec les électrons de molécules ou d'atomes voisins pour reformer des liaisons chimiques covalentes, confère aux radicaux libres une très grande instabilité, une extrême réactivité et la capacité de déclencher la néoformation et la propagation en chaîne d'autres espèces radicalaires. C'est ce processus de transfert et de propagation des radicaux libres que l'on désigne parfois sous le terme évocateur de « cascade radicalaire », et qui, au sein de la matière vivante, peut aboutir à la destruction partielle ou complète des structures cellulaires et tissulaires avoisinantes.

Pour mieux comprendre les mécanismes réactionnels qui se produisent lors de la formation de radicaux libres nous devons savoir qu'il existe deux grandes catégories de réactions ; la réaction ionique et radicalaire.

La réaction ionique se produit lorsqu'il y a rupture hétérolytique et pas symétrique d'une liaison covalente, c'est-à-dire le doublet d'électrons engagés dans une liaison est totalement accaparé par un des deux atomes engagés dans cette liaison, on représente le mouvement des doublets d'électrons par une flèche, il en résulte alors des ions. Le mécanisme réactionnel est représenté par la réaction ci-dessous :



La réaction radicalaire quant à elle se produit lors d'une rupture homolytique d'une liaison covalente faite de deux électrons où chaque atome récupère un électron, il en résulte alors, des radicaux libres, la réaction est représentée ci-dessous :



La réaction radicalaire se passe en trois étapes la première étape est l'initiation ou l'amorçage où il y a production de radicaux libres, la deuxième étape est la propagation

appelée aussi cascade radicalaire où les radicaux libres eux même réagissent avec des molécules pour donner d'autres radicaux libres. La présence d'électrons célibataires confère ainsi une grande instabilité moléculaire à ces entités qui sont alors capables de réagir avec de nombreux composés de façon aspécifique. Afin de se stabiliser, ces molécules ont tendance à récupérer des électrons d'autres molécules, contribuant ainsi à leur haute réactivité. La troisième étape est la terminaison ou rupture, la réaction s'arrête lorsque deux radicaux libres rentrent en réaction pour former des molécules. La terminaison se produit aussi dans l'organisme par l'intervention de molécules réductrices présentes, comme les antioxydants.

II.3. Production des radicaux libres

Comme précédemment expliqué, la principale voie de production des radicaux libres est la rupture homolytique d'une liaison covalente en deux entités possédant chacune un électron, les autres étant l'élimination ou l'addition d'un électron. Ces réactions sont endergoniques c'est-à-dire qu'elles nécessitent un apport énergétique pour pouvoir se réaliser. Nous pouvons distinguer trois voies de production probables de radicaux libres :

II.3.1. Voies physiques

Thermolyse, photolyse, radiolyse et sonochimie. Ces réactions ne se déroulant pas à l'état physiologique dans la cellule, elles ne peuvent être induites qu'uniquement par une source externe, ce qui est rare. Donc leur intérêt est limité dans le cas du modèle que je souhaite présenter ici.

II.3.2. Voies chimiques

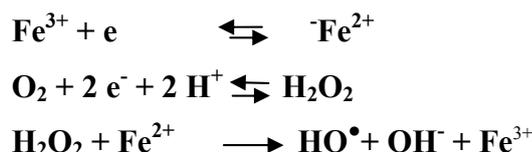
L'oxydoréduction : l'exemple le plus important est la réaction de Fenton. En 1876, H. J. H. Fenton décrit l'oxydation de l'acide tartrique par addition de fer (II) (Wardman and Candeias, 1996). Il mettra en évidence l'action catalytique du fer en 1895. C'est une réaction qui permet la production du radical hydroxyle à partir du peroxyde d'hydrogène en présence d'un métal bivalent (Cu, Fe, ...).



Réaction de Fenton

II.3.3. Voies électrochimiques

La production du radical hydroxyle (HO^\bullet) s'effectue par une réaction appelée Electro-Fenton. Elle consiste à réduire électrochimiquement *via* des électrodes de mercure ou de graphite, le fer ferrique en fer ferreux et l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. Ce système permet de produire les deux espèces nécessaires à la réaction de Fenton (Sies ; 1997).

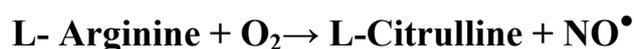


II.4. Radicaux libres en biologie

La biochimie des radicaux libres est née en 1960, quand McCord et Fridovich montrent que l'anion superoxyde est sécrété en milieu vivant. En 1969, ces mêmes chercheurs découvrent la superoxyde dismutase (SOD). En 1970, Murad et Ignarro mettent en évidence les effets relaxants du monoxyde d'azote NO^\bullet , ce qui leur vaut le prix Nobel de médecine en 1998 (Eiserich et al., 1998).

II.4.1. Radicaux libres azotés (RNS)

L'oxyde azotique NO^\bullet est principalement produit par un système enzymatique, la NO-synthase, qui transforme l'arginine en citrulline en présence de la NADPH et de l'oxygène (de Mel et al., 2011; Radi, 2004)



Il est aussi possible de le produire par réduction des nitrites en nitrates sans l'aide de la NO-synthétase. Le NO^\bullet peut réagir avec les thiols libres en donnant naissance aux *S-nitroso thiols* (RSNO), avec les métaux de transition (fer, cuivre) et avec l'anion superoxyde pour former le peroxy-nitrite. La forme acide du peroxy-nitrite (ONOOH) est un oxydant fort, dont la rupture produit deux oxydants puissants (NO^\bullet_2 , $\bullet\text{OH}$). Il peut également s'ajouter au CO_2 pour donner un adduit instable.

II.4.2. Radicaux libres soufrés

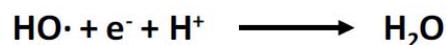
Les radicaux libres soufrés ont pour origine l'oxydoréduction à un électron du couple disulfure / dithiol de protéines ou de petits peptides. Le principal disulfure cellulaire est le glutathion, qui est un tripeptide. Dans le milieu intracellulaire réducteur, il est présent à l'état réduit (GSH). Lors d'une attaque oxydante, il se dimérise pour donner le glutathion oxydé GSSG, tout en passant par le radical thiyle (GS^\bullet) qui est un oxydant fort, puis un disulfure (GSSG^\bullet), représenté dans la série de réactions suivantes :

II.4.3. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des radicaux libres, ou des molécules. Un radical libre est une espèce chimique, neutre ou chargé, qui a la particularité de porter un électron célibataire (non apparié) sur sa couche externe, ce qui le rend généralement instable et capable de réagir rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes. Les réactions de transfert d'électrons qu'il produit (réactions d'oxydoréduction) conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical, ce phénomène pouvant se propager par des réactions en chaîne.



Rupture hétérolytique et homolytique d'une molécule



Etapas de réduction de l' O_2 en H_2O

Tableau 1: Espèces réactives de l'oxygène (ERO) provenant du métabolisme redox intracellulaire où R représente une chaîne carbonée :

$\bullet\text{O}_2^-$: Anion radical superoxide	État de réduction à un électron de l' O_2 formé dans de nombreuses réactions d'auto-oxydation et dans la chaîne de transfert d'électrons de la membrane mitochondriale ou au cours de la lutte des leucocytes contre les bactéries et les virus.
$^1\text{O}_2$ ($\bullet\text{O}-\text{O}\bullet$): Oxygène singulet	Il est produit en présence de rayonnements UV ou par les leucocytes. Il est à l'origine du vieillissement cutané, de la cataracte, de la dégénérescence musculaires liée à l'âge et de certains cancers de la peau.
H_2O_2 : Peroxide d'hydrogen	État de réduction à deux électrons, formé par dismutation de $\bullet\text{O}_2^-$ ou par réduction directe de l' O_2 .
$\bullet\text{OH}$: Radical Hydroxyl	État de réduction à trois électrons, formés par la réaction de Fenton c.-à-d. issu de la réaction du peroxyde d'hydrogène avec des ions métalliques tel que le fer et la décomposition du peroxydinitrite. Extrêmement réactif, elle joue un rôle majeur dans la peroxydation lipidique et dans la destruction du matériel génétique.
ROOH : Hydroperoxide Organique	Formé par des réactions radicalaires avec des composants cellulaires tels que les lipides et les nucléosomes.
ROO \bullet : Radical peroxyde et radical alkoxyde : RO \bullet	Radicaux organiques centrés sur l'oxygène. Les formes lipidiques sont impliquées dans la peroxydation lipidique. Produit en présence d'oxygène par addition radicalaire à des doubles liaisons ou abstraction d'hydrogène.
HOCl : Hypochlorite	Formé à partir de H_2O_2 par la myéloperoxydase. Liposoluble et hautement réactif. Oxyde facilement les constituants protéiques.
OONO $^-$: Radical Peroxynitrite	Issu de la réaction entre $\bullet\text{O}_2^-$ et NO \bullet . Lipide soluble et similaire en réactivité à l'hypochlorite. Il est impliqué dans les maladies neurodégénératives, l'athérosclérose, les maladies inflammatoires chroniques intestinales (maladie de Crohn).
	Produit par des systèmes enzymatiques le NO

NO [•] : Monoxyde d'azote	synthétase est un vasodilatateur physiologique et joue le rôle de messenger inter neuronal.
------------------------------------	---

II.5. Antioxydants

Les antioxydants sont de divers groupes de composés chimiques ou biochimiques qui peuvent être endogènes (enzymatiques et/ou non enzymatiques) ou exogènes tels que les vitamines, les polyphénols et les oligoéléments.

II.5.1. Antioxydants non-enzymatiques

II.5.1.1. Glutathion

II.5.1.1.1. Structure et fonction du glutathion

Le glutathion est un tripeptide, dont le groupement carboxylique en position γ de la chaîne latérale du L-glutamate établit la liaison peptidique avec la cystéine, d'où le nom de γ -glutamyl-cystéinyl-glycine (**Figure 5**).

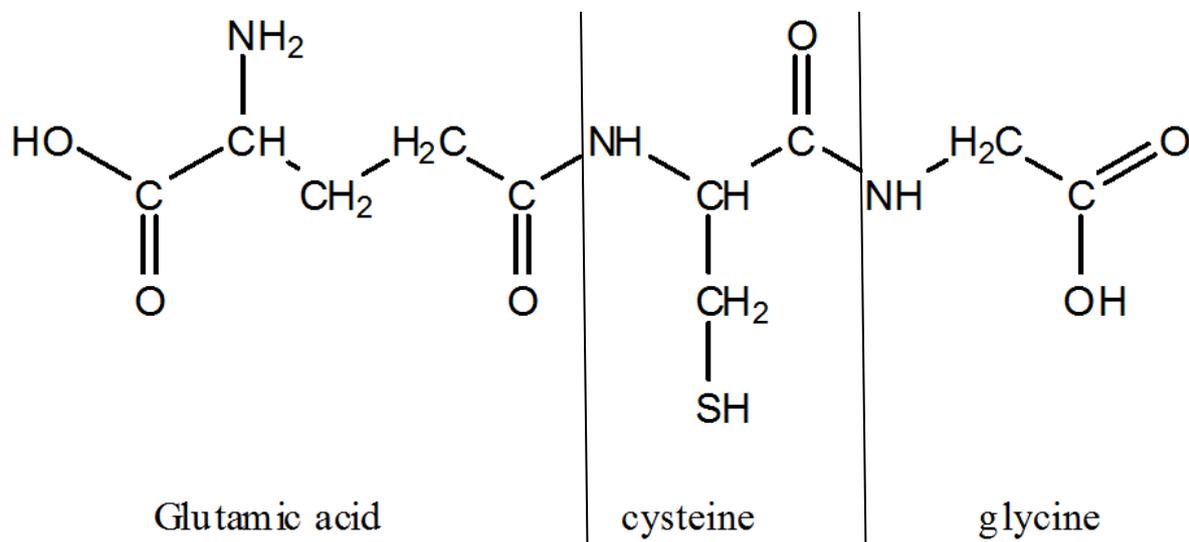


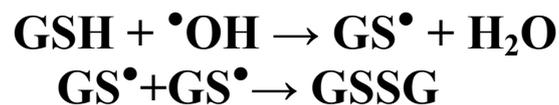
Figure 5: Structure du glutathion (GSH)

Le glutathion est impliqué dans plusieurs mécanismes réactionnels de la cellule comme :

- L'inhibition des radicaux libres ;
- La régulation des activités enzymatiques ;
- La synthèse des protéines ;

- Le transport des acides aminés.

Le glutathion est un puissant réducteur, il peut réagir avec les thiols protéiques ou avec les radicaux libres lors d'une réaction d'oxydation pour former le glutathion oxydé (GSSG). C'est le premier antioxydant cellulaire, omniprésent dans le cytosol à des concentrations de l'ordre de la milli-mole. Il est responsable du maintien du statut redox cellulaire et réalise un tampon redox grâce à sa forte réactivité (Lu, 1999; Schafer and Buettner, 2001). Le glutathion par réaction avec les radicaux libres s'oxyde et se combine par deux molécules pour se stabiliser, formant ainsi le GSSG, ce qui met fin ainsi à la propagation radicalaire en protégeant la cellule et ses constituants. L'exemple d'un schéma réactionnel est le suivant :



IL n'est pas surprenant de trouver donc que la concentration du glutathion réduit (GSH) est très stable et son niveau est de l'ordre de la milli-mole dans tous les types cellulaires humain. D'ailleurs, techniquement, si la préparation des échantillons est bien faite, il est presque impossible de détecter le glutathion oxydé (GSSG) dans les tissus vivants. Ceci illustre l'importance du rôle du glutathion réduit dans la maintenance rigoureuse d'un état réduit dans la cellule. D'autres systèmes enzymatiques s'ajoutent afin de compléter et d'aider à préserver l'abondance du GSH cellulaire. Pour résumer, toute réduction brutale des quantités du glutathion réduit dans les cellules causerait des dommages irréversibles, voir la mort cellulaire.

II.5.1.1.2. Glutathion et réponse anti-oxydante

Le glutathion réduit (GSH) est l'antioxydant à thiol réactif le plus abondant dans les cellules, il est responsable du maintien d'un effet tampon du « statut redox » cellulaire. C'est un substrat de la grande famille des glutathion transférases (GST), qui permettent de conjuguer plusieurs types de molécules pour optimiser leur élimination de la cellule en coopération avec

d'autres transporteurs membranaires (MRP). Les hydroperoxydes lipidiques et le H_2O_2 sont métabolisés par la famille des glutathion peroxydases (GPx, HGPx) en eau et en dérivés alcool respectivement, en utilisant une molécule de GSH, qui forme une molécule du glutathion oxydé (GSSG). Le GSSG formé pendant ces réactions est recyclé sous forme de GSH par la glutathion réductase, préservant le pool cellulaire du GSH.

II.5.2. Antioxydants enzymatiques

Ce sont des molécules enzymatiques. Elles constituent les premières défenses anti-oxydantes et auxiliaires dans l'organisme via la régénération du GSH et son transport. Il existe également d'autres défenses anti-oxydantes telles que les transferrines, les ferritines, les métallothionéines. Ces dernières sont des molécules protéiniques, qui en se complexant aux métaux, limitent leurs disponibilités dans le processus de génération des radicaux libres.

II.5.2.1. Superoxyde dismutase (SOD)

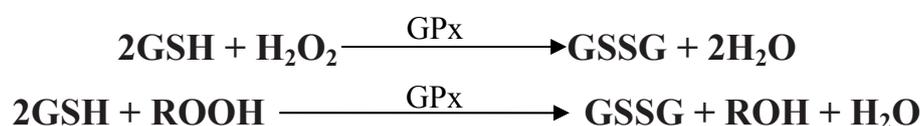
La SOD est une métalloprotéine, qui représente une des premières lignes de défense contre le stress oxydant, elle assure l'élimination de l'anion super-oxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène.



Mécanisme réactionnel de l'élimination de l'anion super-oxyde *in vivo*

II.5.2.2. Glutathion peroxydase (GPx)

La GPx est une sélénoprotéine. Elle réduit les peroxydes et hydroperoxydes (Brigelius-Flohé, 2006), et donc protège les cellules contre les dommages oxydatifs. Cette enzyme est synthétisée au niveau du foie et des reins, donc sa concentration dépend du bon fonctionnement de ces deux organes.



II.5.2.3. Glutathion S transferase (GST)

Les glutathione-S-transférases (GSTs) sont une grande famille des enzymes de la phase II de détoxification. Les enzymes de la phase I sont souvent des cytochromes responsables de l'activation des toxines, les rendant ainsi électrophiles. Les GSTs catalysent la réaction de conjugaison du glutathion réduit à des composés endogènes ou exogènes électrophiles. Les produits dérivés de ces réactions sont inactifs et sont éliminés facilement par l'organisme, majoritairement dans les urines. Les GSTs se composent de deux familles, les membranaires et les cytosoliques. Comme les mécanismes réactionnels des GSTs ne sont pas spécifiques à des structures chimiques bien définis mais plutôt à des groupements réactionnels chimiques, leurs rôles deviennent cruciaux dans la protection des cellules au cours de l'inflammation. Où une multitude de métabolites toxiques sont produits (Townsend and Tew, 2003).

II.5.2.4. Glutathion réductase (GR)

La GR est une flavo-protéine, elle joue un rôle important dans le métabolisme redox cellulaire, c'est une des enzymes la plus étudiée. La GR assure le recyclage du GSSG en GSH avec l'acide ascorbique (vitamine C) comme cofacteur. Ce qui rend le métabolisme du GSH dépendant d'apports extérieurs en acide ascorbique.



II.5.2.5. Thiols

Le taux des protéines thiols libres est l'un des marqueurs les plus importants du stress oxydatif.

Le soufre existe de manière stable dans de multiples états d'oxydation, ce qui en fait un composant polyvalent dans les systèmes biologiques. La forme la plus active et la plus réduite du soufre dans les biomolécules est le thiol (-SH), présent dans l'acide aminé cystéine (Cys). Ce dernier est présent dans le site actif de nombreuses protéines et dans des motifs protéiques qui fonctionnent dans la régulation enzymatique, le trafic de protéines, le contrôle de

l'expression génique et le récepteur signalisation. L'approvisionnement du corps en Cys provient des protéines de l'alimentation et de la transsulfuration de l'acide aminé alimentaire essentiel, Méthionine. Les données accumulées suggèrent que les oxydations réversibles des résidus de soufre sont courantes et fondamentalement importantes dans le contrôle des fonctions cellulaires,(Dickinson and Forman, 2002; Gulati et al., 2001; Moran et al., 2001). En effet les thiols protéiques indiquent l'état d'oxydation de la cellule de sorte que plus il y a de thiols oxydés, plus la cellule est stressée.

II.5.3. Antioxydants exogènes ou naturels

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants naturels ou diététiques *in vivo* comme la vitamine E, la vitamine C, la vitamine A, les caroténoïdes, les acides phénoliques et les flavonoïdes, elles stabilisent les membranes cellulaires en diminuant leur perméabilité et elles ont la capacité de se lier avec les acides gras libres en limitant leur oxydation.

- **La vitamine E :**

La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable(Wang and Quinn, 1999). L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol, connu comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO_2^{\cdot} . Elle empêche aussi les radicaux libres d'attaquer les graisses des membranes cellulaires et d'oxyder la vitamine A. Elle joue un rôle préventif dans le développement des cancers (Kline et al., 2007, 2003; Yu et al., 2008). Cette vitamine limite les effets néfastes du cholestérol et donc prévient l'athérosclérose(Singh et al., 2005).

La vitamine E se trouve dans les huiles végétales principalement l'huile de germe de blé et de tournesol. Les huiles d'olives, d'arachides, de carthames, de sésames de maïs et de soja en sont aussi une bonne source de vitamine E ainsi que les céréales, les fruits oléagineux et les graines. L'apport en vitamine E est essentiel pour le bon fonctionnement des organes.

- **La vitamine C :**

La vitamine C est un antioxydant puissant qui intervient dans les réactions non enzymatiques produisant dans les fluides biologiques en piégeant les espèces réactives de l'oxygène (Carr and Frei, 1999). En plus de son rôle antioxydant, elle permet la régénération de la vitamine E. Elle existe sous deux formes : l'acide ascorbique (ascorbate) et l'acide dihydroascorbique (déhydroascorbate).

Par interaction avec un radical lipidique R^\bullet , la vitamine E se transforme en un radical tocophéryle (T-O $^\bullet$). Ce dernier est régénéré en T-OH sous l'action de la vitamine C (Asc-H-) qui, à son tour, prend une forme radicalaire (Asc $^\bullet$). Le glutathion réduit (GSH) permet de régénérer la vitamine C en se transformant en un radical thyle (GS $^\bullet$) qui, par réaction avec lui-même, donne du glutathion oxydé (GSSG) (Vertuani et al., 2004). Ainsi, la vitamine C contribue au bon fonctionnement du système anti-radicalaire cellulaire en maintenant le GSH en état réduit grâce à la glutathion réductase.

- **Les caroténoïdes :**

Précurseurs de la vitamine A, les caroténoïdes sont des antioxydants, ils peuvent être classés en deux principaux groupes :

- Les caroténoïdes hydrogénés appelés couramment les carotènes comme le β -carotène et le lycopène ;
- Les caroténoïdes hydroxylés ou les xanthophylles, molécules plus polaires comme la lutéine et la zéaxantine.

L'effet antioxydant du bêta-carotène a bien été étudié. Grâce à son système de doubles liaisons conjuguées, le bêta-carotène fixe les radicaux peroxy ROO^\bullet et le radical formé est stabilisé par mésomérie. De ce fait, la propagation des oxydations en chaîne s'en trouve inhibée. Aussi, le bêta-carotène neutralise l'oxygène singulet.

- **Les polyphénols :**

Ils constituent une famille importante d'antioxydants présents dans les végétaux. L'alimentation fournit environ 1g de polyphénols par jour principalement par l'apport en fruits et, dans une moindre mesure, en légumes et en céréales. Ils sont présents sous forme d'anthocyanine dans les fruits rouges et le vin rouge, sous forme de flavonoïdes dans les agrumes, l'huile de lin et sous forme d'épicatéchine dans le vin, le thé, le chocolat, les pommes, les oignons et les algues brunes. Globalement, ce sont d'excellents piègeurs des

ERO et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre. Les polyphénols naturels vont de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins.

II.5.4. Autres antioxydants

Les oligo-éléments comme le sélénium, le zinc et les acides aminés peuvent jouer un rôle important dans le maintien de l'intégrité des fonctionnalités des constituants cellulaires, en fournissant une protection *via* une action directe comme l'acide lipoïque ou indirecte par leur participation à la synthèse des enzymes antioxydants (superoxyde dismutase et glutathion peroxydase).

- **Le sélénium :**

Le sélénium n'est pas un antioxydant en tant que tel, car il ne peut piéger les radicaux libres, mais il joue un rôle primordial comme cofacteur de la GPx qui est incorporée dans les séléno-protéines, qui jouent un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs (Brigelius-Flohé, 2006; Hatfield and Gladyshev, 2002; Rayman, 2005; Whanger, 2004). Dans l'alimentation, on retrouvera essentiellement du sélénium organique lié à un acide aminé : la cystéine. Le sélénium organique est mieux absorbé, il subit une métabolisation hépatique qui conduit à des intermédiaires nécessaires à la synthèse de dérivés physiologiquement actifs comme la GPx. La dose journalière recommandée est de 50-70 µg/jour. Les aliments riches en sélénium sont notamment, les noix de Brésil, les brocolis, l'ail.....

- **Le cuivre :**

À concentration physiologique, le cuivre est le cofacteur d'enzymes comme la SOD. Cependant, en tant que métal de transition, il joue un rôle important dans le déclenchement de réactions de production d'ERO (réactions de Fenton). Les apports journaliers recommandés sont de l'ordre de 2,5 mg. Il est présent dans le son, l'avoine, le seigle et le foie de veau.

- **Le zinc :**

Le zinc réduit le stress oxydatif cellulaire, c'est un puissant piègeur de radicaux hydroxyles (Maret, 2003; Sato and Bremner, 1993). Il protège également les groupements thiols des protéines et il peut inhiber les réactions de formation d'ERO induites par des métaux de transition comme le fer ou le cuivre. Le rapport Cu / Zn, (normalement inférieur à 1,5) sera un excellent indicateur de l'état de stress oxydant d'un individu. Il a été prouvé que le zinc prévient le cancer ainsi que la dégénérescence maculaire lorsqu'il est prit à une dose journalière de 80mg par jour pendant 6 ans, sur une expérience faite sur des sujets à très haut risque (As and O, 2002). Les aliments les plus riches en zinc sont les viandes, les poissons, les céréales complètes et les légumes secs; les apports journaliers recommandés pour des personnes saines, sont de l'ordre de 20 mg.

II.6.Inflammation :

L'inflammation est une réponse physiologique de défense ou d'adaptation à une agression qui peut être un microorganisme ou toutes substances particulières ou solubles étrangère à l'organisme

II.6.1. Inflammation et Stress oxydant

Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédant le stress oxydatif est dû au déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la disponibilité d'antioxydants ou de piègeurs de radicaux libres. L'excès d'ERO peut soit oxyder des biomolécules, soit modifier structurellement des protéines et des gènes afin de déclencher des cascades de signalisation pouvant conduire à l'apparition et à la progression de maladies inflammatoires. L'activation induite par les ERO de facteurs de transcription et de gènes pro-inflammatoires entraîne l'apparition d'une inflammation. L'inflammation amène les cellules immunitaires à sécréter diverses cytokines et chimiokines (Pasquier, 1995) afin de recruter diverses autres cellules immunitaires sur le site du stress oxydatif/de l'infection. Par réflexe, une génération améliorée d'ERO par les cellules immunitaires au site de l'inflammation provoque un stress oxydatif et des lésions tissulaires (Shampa Chatterjee, 2016). Cette interrelation entre stress oxydatif et inflammation est schématisée dans le schéma ci-dessous en vue de mettre en évidence le rôle des voies « ERO-induites-inflammation ».

Le stress oxydatif est associé à l'inflammation dans différentes pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires, le cancer, les troubles neurologiques, le diabète et le vieillissement (Dalle-Donne et al., 2006; Dhalla et al., 2000; Jenner, 2003; Sayre et al., 2001).

Ces maladies se répartissent en deux groupes :

- ✚ le premier groupe implique des maladies caractérisées par des pro-oxydants déplaçant l'état d'oxydoréduction thiol/disulfure. Les conditions dites de "stress oxydatif mitochondrial" (cancer et diabète sucré).
- ✚ le deuxième groupe concerne les maladies caractérisées par des "conditions oxydatives inflammatoires" et une activité accrue de la NAD(P)H oxydase (conduisant à l'athérosclérose et à l'inflammation chronique).ou à la formation des ERO.

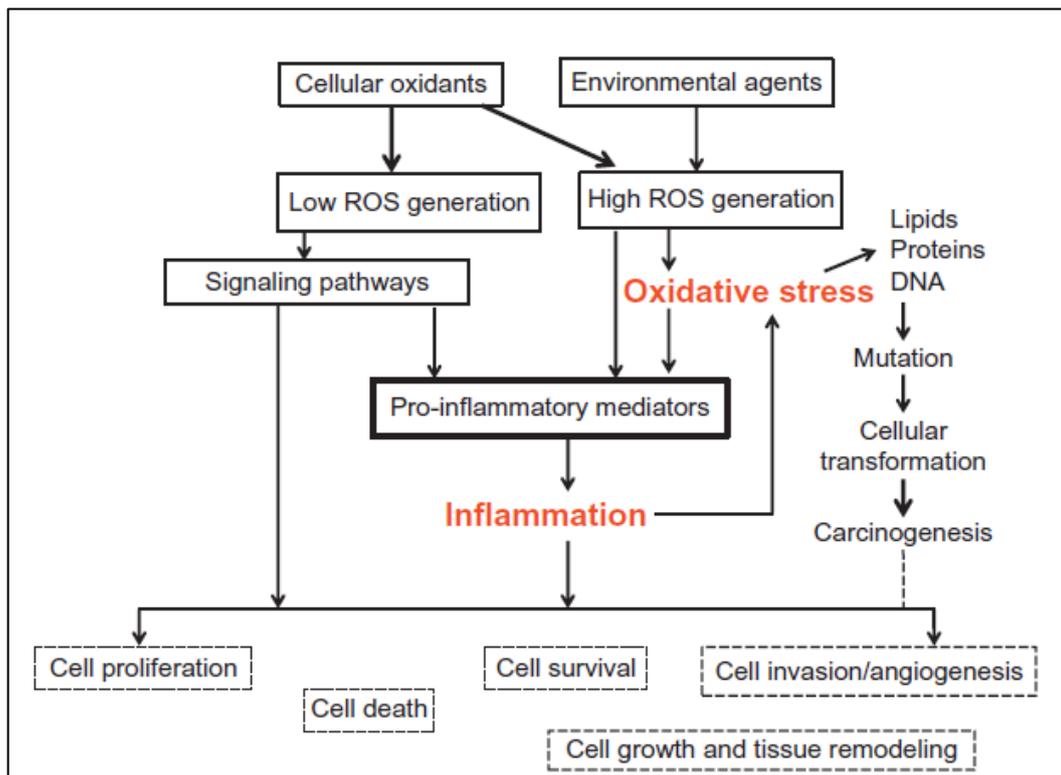


Schéma 1 : Interrelation entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO), le stress oxydatif, l'inflammation et la physiologie cellulaire et pathologique (Shampa Chatterjee, 2016).

II.6.2. Anti-inflammatoires d'origine végétale

Les plantes à effet anti-inflammatoires sont très importantes dans la vie quotidienne des populations, ouvrant ainsi un champ de soins phytothérapeutiques, regroupant des espèces de diverses familles dont les principes actifs présumés responsables de l'activité anti-inflammatoire sont de nature chimique variée. Dans ce contexte, plusieurs exemples de plantes peuvent être cités :

- ✚ *Artemisia herba-alba* : Des études *in-vivo* et *in-vitro* ont été menées dans le but de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire des extraits aqueux et sur des huiles essentielles de la plante *Artemisia herba-alba* (Abu-Darwish et al., 2015; Conway, 1975; Khlifi et al., 2013; Marrif et al., 1995; Morán et al., 1989). En effet son activité anti-inflammatoire a bien été prouvée.
- ✚ *Curcuma longa* (curcuma) : Elle possède un effet anti-inflammatoire puissant (Buhrmann et al., 2021). Le curcuma contient un pigment jaune appelé curcumine, un polyphénol qui diminue de manière dose dépendante la production de monoxyde d'azote (NO) et l'expression de l'enzyme NO Synthase (NOS) inducible.
- ✚ *Zingiber officinale* (gingembre) : Elle contient un grand nombre de constituants : Gingerol, beta carotène, capsaïcine, acide caféique et curcumine, dont l'activité anti-inflammatoire est bien évidente en plus de son effet neuro-protectif (Almohamed et al., 2021).
- ✚ *Baccharis trimera* (Carqueja) : Est une plante médicinale utilisée pour le traitement de maladies inflammatoires tel que le rhumatisme (de Oliveira et al., 2012; Paiva et al., 2015).
- ✚ *Arnica montana* (Arnica) Largement utilisée dans le traitement des œdèmes. Son effet anti-inflammatoire revient à ces sesquiterpènes lactones (helenaline, dihydrohelenaline) impliqués dans la transcription de médiateurs pro-inflammatoires (da Silva Prade et al., 2020).
- ✚ *Harpagophytum procumbens* : L'activité anti-inflammatoire de cette plante endémique de l'Afrique a été largement investiguée *in vivo* et *in vitro* (Ferrante et al., 2017). Elle réduit significativement les œdèmes de la patte (piqûres d'insectes ou morsures de serpents).

Nous avons résumé dans le **Tableau 2**, quelques plantes médicinales à effet anti-inflammatoire supplémentaire.

Tableau 2 : Quelques plantes médicinales à effet anti-inflammatoires(Moon and Shibamoto, 2009)

Nom scientifique	Famille	Partie utilisée	Nom commun	Utilisation
<i>Helleborus orientalis L.</i>	Ranunculaceae	Racines	Lenten-rose	oedemes, douleurs rhumatismales
<i>Urtica dioica</i>	Urticaceae	Feuilles, Racines	Ortie	rhinite allergique, eczéma, goutte, douleurs rhumatismales
<i>Laurocerasus officinalis R.</i>	Rosaceae	Feuilles	Laurier	fièvre, pharyngite, douleurs d'estomac, hémorroïdes
<i>Nerium oleander L.</i>	Apocynaceae	Fleurs	Laurier rose	douleurs, maux de tête
<i>Rhododendron ponticum L.</i>	Ericaceae	Feuilles	Rhododendron pontique	oedèmes, états grippaux, mal de dents
<i>Juglans regia L.</i>	Juglandaceae	Feuilles, fruits	Noyer commun	douleurs rhumatismales, fièvre, eczéma. Malaria
<i>Oenothera biennis</i>	Onagraceae	Graines	Onagre bisannuelle	douleurs rhumatismales,

Méthode expérimentale

Chapitre III

Matériel et méthode

III.1. Préparation du matériel végétal

Des échantillons d'*Artemisia herba-alba* ont été collectés dans la ville de Bejaia dans la commune de Béni Maouche (située à l'est de l'Algérie) en août 2017. L'identité taxonomique de la plante a été confirmée en comparant un spécimen de référence avec une identité connue déjà déposée dans l'herbier (N ° 02888). L'espèce a été identifiée par le Dr Hadjadj-Aoul Seghir et stockée comme spécimen de référence dans l'herbier végétal du département de biologie, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Algérie. Les parties aériennes fraîches (tiges et feuilles) récoltées ont été rincées avec de l'eau distillée, puis séchées dans un four ventilé pendant 72 h à 40 ° C, ensuite broyé. La poudre a été passée à travers un tamis standard de 250 µm et seule une fraction avec une taille de particule <250 µm a été utilisée. La poudre a été conservée dans des bocaux en verre ambré jusqu'à son utilisation.

L'extraction a été réalisée en utilisant des solvants de différentes polarités: eau distillée, méthanol / eau (80:20, v / v), éthanol / eau (80:20, v / v), acétone / eau (80:20, v / v) et un mélange de méthanol, d'éthanol, d'acétone et d'eau (25: 25: 25: 25, v / v / v / v).

III.2. Préparation des extraits de la plante *Artemisia herba alba*

L'extraction a été réalisée en utilisant deux méthodes ; l'extraction assistée au micro-onde et l'extraction par macération. Nous avons utilisé des solvants de polarités différentes : eau distillée, méthanol (80:20, v/v), éthanol (80:20, v/v), acétone (80:20, v/v) et un mélange équimolaire de solvants à savoir ; méthanol, éthanol, acétone, eau (25: 25: 25: 25, v/v/v/v).

III.2.1. Extraction par solvant assistée au micro-onde

L'extraction par solvant assistée au micro-onde est une technique innovante qui permet d'obtenir des principes actifs en moins de temps et avec peu de solvant et est protectrice de l'environnement, développée pour l'extraction d'analytes à partir de matrices solides.

Un four à micro-onde domestique modifié (**Figure 6**) a été utilisé pour effectuer l'extraction sous un volume d'échantillon constant. Le micro-onde (NN-S674MF, Samsung, Malaisie) avec des dimensions de cavité de 22,5 cm × 37,5 cm × 38,6 cm est équipé d'un

système de contrôle numérique pour l'irradiation à une fréquence de 250 kHz et puissance micro-ondes réglable de 200 à 1000 W.

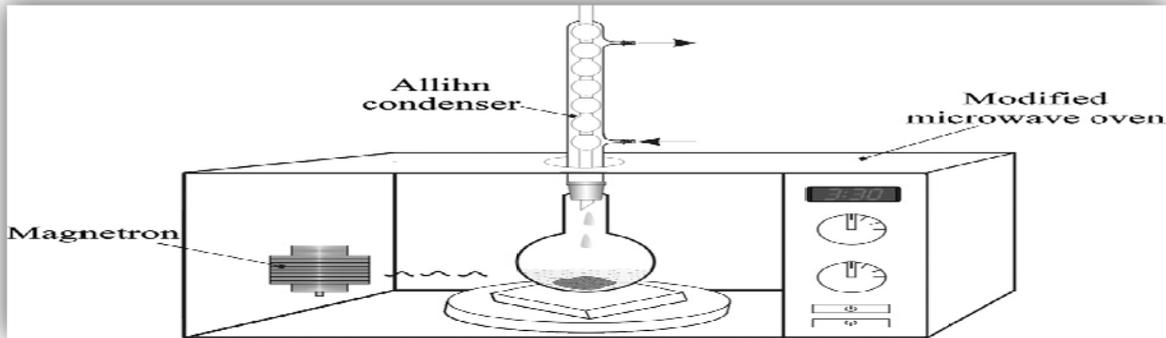


Figure6 : Dispositif d'un micro-onde modifié pour l'extraction par solvant

Six grammes de poudre ont été ajoutés à 120 ml de solvant d'extraction à 80% (v /V). Le mélange a été chauffé à une puissance de 200 W pendant 25 minutes. Les extraits ont été concentrés par évaporation rotative sous vide jusqu'à solidification et stockés à -80°C . Toutes les solutions mères ont été préparées fraîchement avant chaque utilisation à 10 mg / ml (m/V) de chaque extrait d'AHA dans du DMSO.

III.2.2. Extraction par macération

L'extraction au solvant par macération est une méthode d'extraction conventionnelle, elle consiste à extraire une substance présente dans une matrice végétale à froid en la laissant séjourner dans un solvant organique pour en extraire les constituants solubles dans ce solvant (**Figure 7**). Six grammes d'échantillon de poudre ont été placés dans un volume de 120 ml de solvant d'extraction à 80% (v/v) et le mélange de solvants : méthanol, éthanol, acétone, eau distillée (2 5:25:25:25, v/v/v/v). Le mélange a été soumis à une agitation magnétique pendant 24 heures à 10°C dans une pièce sombre. Les extraits ont été concentrés par évaporation rotative sous vide et stockés à -80°C . À l'exception des mesures de la teneur totale en polyphénols, toutes les solutions mères ont été préparées fraîchement avant chaque utilisation à 10 mg/ml (m/V) de chaque extrait d'AHA dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

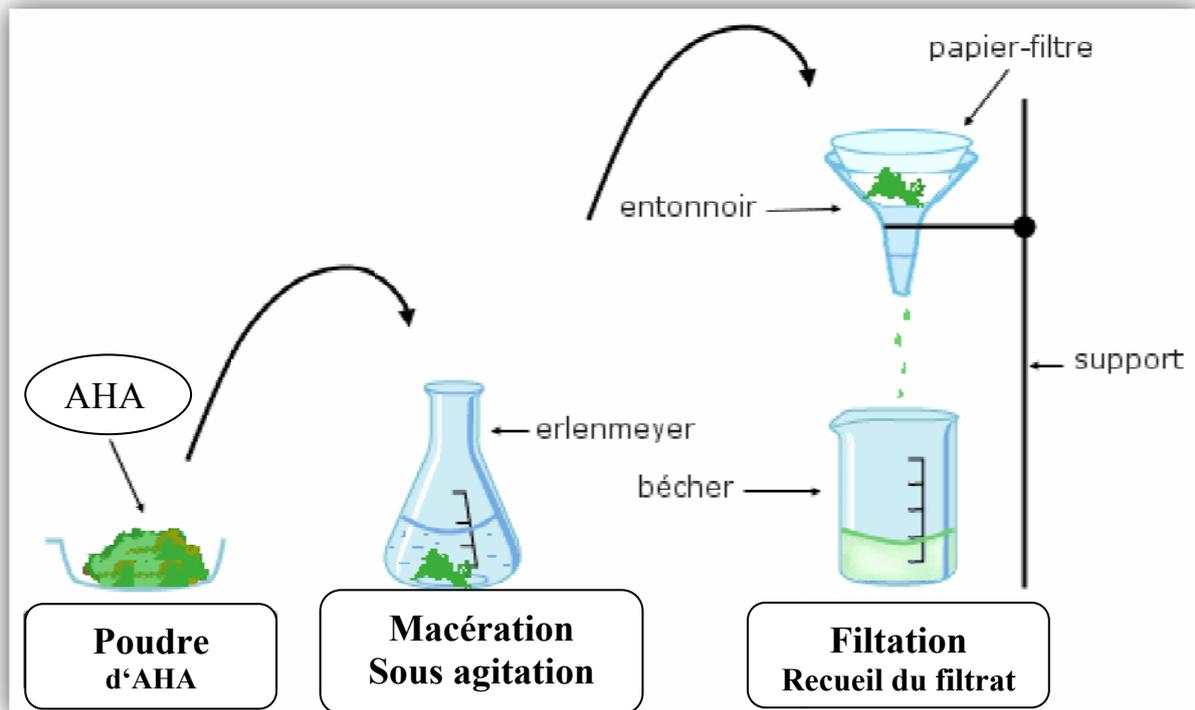


Figure 7 : dispositif d'extraction par macération

III.3. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été déterminée selon le test Folin-Ciocalteu (Folin and Ciocalteu, 1927; Folin and Denis, 1912). Ce teste est basé sur l'oxydation des cycles phénoliques (Lhuillery, 2006). Le réactif de coloration jaune est un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdique ($H_3PM_6O_{12}O_{40}$). En milieu alcalin la dissociation d'un proton phénolique mène à un anion phénolate. Ce dernier est capable de réduire les acides du réactif en oxyde bleu de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) par des réactions impliquant le transfert d'électrons. L'intensité de la couleur bleue est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques oxydés.

Les solutions de travail pour les dosages ont été obtenues par dilution des solutions mères à 1:50 dans du DMSO. Les concentrations finales de solutions de travail étaient de $200 \mu g / ml$. 2 ml de solutions de travail provenant de différents extraits d'*Artemisia herba alba* ont été mélangés avec 10 ml d'eau distillée, puis nous lui avons rajouté 1 mL de réactif de Folin-

Ciocalteu (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, France) et nous avons complété au volume de 25 mL avec du carbonate de sodium à 1,5 M. L'absorbance des échantillons a été mesurée à une longueur d'onde de 740 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, après incubation à 25 °C pendant 30 min. Les teneurs totales en polyphénols ont été exprimées en mg/ml, en utilisant la courbe d'étalonnage: $y = 4,394 X + 0,021$ ($R_2 = 0,9979$) (voir détails en annexes), exprimées en milligrammes d'acide gallique normalisé à l'extrait séché (mg/g) et calculées à l'aide de la formule suivante :

$$\frac{De \times Mo \times 1000}{Do \times Me}$$

III.4. Teste de piégeage du radical libre DPPH

Le taux de radicaux libres DPPH a été déterminé selon la méthode de (Meda et al., 2017). Le principe est fondé sur le pouvoir des antioxydants qui jouent le rôle de piègeurs de radicaux libres. En présence de ces antioxydants : soit synthétiques ou naturels (dans notre cas l'extrait de plante), le radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), qui est caractérisé par sa couleur violette, se réduit en 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune. L'activité anti-oxydante des extraits d'*Artemisia herba-alba* a été mesurée par blanchiment de la solution violette du radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH).

Une solution de 2,5 µg / mL dans du DMSO d'extraits séchés est utilisée comme solution d'extrait de travail. Dix microlitres de solution d'extrait de travail d'*Artemisia herba-alba* sont mélangés avec 2,5 ml de DPPH (633 mM) incubés pendant 30 min à 37 °C, et l'absorbance à 515 nm a été mesurée. La capacité antioxydante a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH (% d'inhibition DPPH) calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Pourcentage d'inhibition DPPH (\%)} = [(Ab_{S_{\text{control}}} - Ab_{S_{\text{sample}}}) / Ab_{S_{\text{control}}}] \times 100.$$

$Ab_{S_{\text{control}}}$ est l'absorbance du radical DPPH et l'eau distillée;

$Ab_{S_{\text{sample}}}$ est l'absorbance du radical DPPH et l'extrait de plante à 30 min.

III.5. Isolement des globules blancs mononucléés (WBC) et culture cellulaire

Les échantillons de sang totaux ont été prélevés sur des volontaires humains en bonne santé (n = 3 volontaires, Établissement Français du Sang, EFS, Clermont-Ferrand, France). Ils ont été soigneusement stratifiés sur un double gradient de Ficoll – Histopaque1119[®] et 1077[®] décrite par la méthode de(Cholet et al., 2019; Gainche et al., 2020). Après centrifugation (400 x g, 40 min à 20 ° C), la première couche de plasma a été aspirée, donnant une phase de monocytes et lymphocytes (PBMC) juste au-dessus de la couche de 1,077 g/ml. Ensuite, la couche de Ficoll a été aspirée, donnant une phase de cellules polymorphonucléaires (PMN) correspondant à une densité comprise entre 1,119 et 1,077 g/mL. Les PBMC ont été lavées avec du RPMI et centrifugées (5 min, 400 x g) deux fois, puis mises en suspension dans 5 ml de RPMI supplémenté (FBS10%, gentamicine 50 µg / ml et glutamin 2 mM). Pendant ce temps, les érythrocytes résiduels dans la phase PMN ont été lysés par choc hémolytique en utilisant une solution de chlorure d'ammonium. Les PMN ont ensuite été lavés avec du RPMI, centrifugés et mis en suspension dans 1 mL de RPMI supplémenté. Des lignées de cellules lymphoïdes T humaines (Jurkat) ont été obtenues à partir d'une collection de cellules ATCC et maintenues dans un milieu RPMI-1640 (Biovest, Nuaille, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal L-glutamine (2 mM), pénicilline 50 mL et streptomycyn (50 µg/mL) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Les cellules (Jurkat et WBC) ont été cultivées à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂. Les deux préparations cellulaires ont été ajustées à une densité de 10⁶ cellules/ml pour tous les tests.

III.6. Quantification de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Le test de production des ERO a été réalisé en utilisant de la dihydrorhodamine 123 (DHR) 10 mM (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) qui est un indicateur non fluorescent d'espèces réactives de l'oxygène qui peut diffuser passivement à travers les membranes cellulaires où il est oxydé en rhodamine 123 et détecté comme une fluorescence verte. Des globules blancs humains (PBMCs) et des lignées cellulaires humaines Jurkat ont été placés sur une plaque à une densité de 1,10⁶ cellule/ml dans une plaque à 96 puits. Les PBMCs et les cellules Jurkat ont été traités avec des extraits dilués d'*Artemisia herba-alba* en

commençant par concentration de la solution mère de 10 mg/mL. Des dilutions ont été effectuées de telle sorte que les concentrations finales dans les puits soient de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL et 10 µg/mL. Une partie des cellules a été plaquée avec du PMA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) 1 µM et les autres ont été laissés sans PMA comme témoins. La production des ERO a été mesurée toutes les 5 min pendant 2 h à 37 ° C, à l'aide d'un lecteur de microplaques (Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer[®], Thermoscientifique Waltham, MA) réglé sur une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm. Tous les dosages ont été réalisés en triple.

III.7. Mesure des activités enzymatiques

Les protéines ont été quantifiées par la méthode de l'acide bicinchonique (BCA de Pierce, Interchim, France) selon les instructions du fabricant. La courbe standard a été obtenue avec une solution standard de sérum albumine bovine (2 g/L).

L'activité de la glutathion réductase (GR) a été déterminée comme indiqué précédemment (Arab et al. 2006b). Le lysat cellulaire a été incubé avec un réactif tampon (Tris-HCl 100 mM, EDTA 1 mM, NADPH 0,16 mM et glutathion oxydé 4,6 mM (GSSG), pH 7,4) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). L'oxydation cinétique du NADPH a été suivie à 340 nm et 37 ° C pendant 3 minutes dans un lecteur de spectrophotomètre pour microplaques. L'activité GR, normalisée à la teneur en protéines, était en UI/g.

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a conduit à l'oxydation du GSH en présence de tert-butyl-hydroperoxyde. Secondairement GR recyclé GSSG en présence de NADPH comme décrit précédemment (Mahbouli et al. 2018). Le lysat cellulaire a été incubé avec un réactif tampon (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 22 mM Tert-butyl-hydroperoxyde, 5 mM GSH, 0,1 UI/ml GR, 2 mM NADPH, pH 7,4). (Sigma-aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). L'oxydation du NADPH a été mesurée en utilisant un lecteur de spectrophotomètre pour microplaques réglé à 340 nm et 37 ° C. L'activité GPx a été normalisée à la teneur en lysat des cellules protéiques et exprimée en UI/g de protéines. L'activité de la glutathion S-transférase (GST) a été quantifiée selon la méthode décrite dans (Arab et al 2006a). Le lysat cellulaire est incubé avec un réactif tampon (50 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzène, pH 7,4). (Sigma-aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). La 1-chloro-2,4-dinitrobenzène-glutathinylation cinétique a été suivie à 340 nm et à 37 °C dans un lecteur de spectrophotomètre pour microplaques. L'activité GST normalisée à la teneur en protéines était en UI/g.

III.8. Glutathion total et glutathion protéique

Le glutathion total a été déterminé par la méthode de (Cereser et al., 2001). En bref, un lysat cellulaire réduit en dithiothréitol (DTT) pendant 10 min à température ambiante et de l'ester éthylique de glutathion a été ajouté comme étalon interne. Après précipitation des protéines, le surnageant a été dérivé en ajoutant de l'ortho-phthalaldéhyde (OPA) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). La séparation HPLC des adduits GSH-OPA a utilisé une colonne de silice en phase inversée UP3 HDO C-18 (150 × 3,60 mm, granulométrie 3 µm) de Phenomenex (Interchim, Montluçon, France), maintenue à 37 °C suivie d'une détection fluorimétrique à 420 nm après excitation 340 nm (système HPLC Summit, Dionex SA, Courtaboeuf, France). Les dérivés sont élués en utilisant un gradient d'acétonitrile de 10 à 15% dans un tampon phosphate 25 mM à pH 6 pendant 5 min. Le débit était de 0,25 ml/min pour une élution de 20 min. Les chromatogrammes ont été intégrés à l'aide du logiciel Chromeleon de Dionex (version 6.80, Dionex SA, Courtaboeuf, France). Teneur en GSH, calculée à l'aide d'une courbe standard tracée dans les mêmes conditions et exprimée en µmol/g de protéine. Les thiols protéiques ont été dosés selon la méthode de (Himmelfarb et al., 2000). En bref, des groupes thiol libres oxydés par l'acide dithiobis-2-nitrobenzoïque (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) ont été mesurés à 405 nm sur un lecteur spectrophotomètre microplaque. La concentration de thiol sans lysat cellulaire a été exprimée sous la forme d'un rapport à la teneur en protéines en mmol/g.

III.9. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été estimée par le dosage à la résazurine en utilisant la 7-hydroxy-3H-phénoxazin-3-one (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) comme décrit dans le protocole de fabrication (Abcam, Paris, France). La résazurine oxydée, bleue et non fluorescente est réduite en résorufine un colorant fluorescent rose par activité cellulaire, en raison de la consommation d'oxygène par le métabolisme, qui est donc proportionnelle à la respiration aérobie. En bref, des cellules blanches périphériques mononucléaires (PBMC) et des lignées de cellules cancéreuses leucémiques humaines (Jurkat) ont été placées à une densité de $1,10^6$ cellule/ml dans une plaque à 96 puits. Les globules blancs et les cellules Jurkat ont été traités avec des extraits dilués d'*Artemisia herba-alba* en commençant par une concentration de

solution mère de 10 mg/ml. Des dilutions ont été effectuées de sorte que les concentrations finales dans les puits soient de 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml et 10 µg/ml. Une partie des cellules/extraits a été plaquée avec du PMA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) 1 µM et les autres ont été laissés sans PMA comme témoins. L'oxydation de la résazurine a été mesurée toutes les 5 min pendant 2 h à 37 °C, à l'aide d'un fluoroscan (Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer®, Thermoscientifique Waltham, MA) réglé sur une longueur d'onde d'excitation de 544 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. Tous les dosages ont été réalisés en triple.

III.10. Caractérisation par HPLC-UV des constituants chimiques de l'extrait d'*Artemisia herba-alba* obtenu par macération méthanolique

Cette expérience a été réalisée en utilisant une HPLC analytique qui se compose de deux pompes L7100, d'un passeur d'échantillons L7200, d'un détecteur à barrette de diodes L2450 LaChrom Elite, d'un contrôleur de système d'interface D7000 et d'un logiciel EZ Chrom Elite (VWR-Hitachi, Radnor, Pennsylvanie, PA, États-Unis). L'extrait méthanolique macéré ayant une concentration de 5 mg/mL a été analysé à l'aide d'une colonne Purospher® RP8e (125 × 4 mm, granulométrie 5 µm).

Une élution en gradient a été utilisée avec une phase mobile constituée d'eau contenant 1% d'acide phosphorique (A) et d'acétonitrile (B).

Le programme a été défini comme suit :

- Le temps de rétention : 0-15 min, 10-15 % B ; 15-25 min, 15 % B ; 25 à 40 min, 15 à 20 % B ; 40 à 45 min, 20 à 40 % de B.
- Le débit était de 1,0 mL/min
- le volume d'injection était de 10 µL.
- L'analyse a été effectuée à une longueur d'onde de détection de 280 nm
- La colonne a été maintenue à température ambiante.

L'acide chlorogénique, l'acide néochlorogénique et l'acide 3,5-dicaffeoylquinique viennent de Extrasynthese (Genay, France). Le schaftoside, l'apigénine 6,8-diglucoside et l'acide 4,5-dicaffeoylquinique ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich Chemical (Saint-Quentin Fallavier, France).

L'identification des principaux composants phénoliques d'*Artemisia herba-alba* a été confirmée en comparant leurs temps de rétention et leurs spectres UV avec ceux d'étalons commerciaux authentiques.

Chapitre IV

Résultats et discussion

Afin de mieux comprendre les mécanismes biomoléculaires anti-inflammatoires de la plante *Artemisia herba-alba*, dont le but finale est d'expliquer les effets protecteurs à long terme contre les maladies chroniques lors d'une consommation régulière ou lors d'un usage temporaire en cas d'une inflammation aigue, nous avons étudié *in vitro* et *in vivo* les capacités anti-oxydantes des extraits d'AHA obtenus à partir de différentes méthodes d'extraction, c'est-à-dire macération ou micro-ondes et en utilisant des solvants de différentes polarités ; (eau, méthanol, éthanol, acétone et mélange de tous les solvants à volumes égaux) testés sur des globules blancs extraits du sang total humain et sur la lignée cellulaire leucémique Jurkat.

Dans un premier temps nous avons estimé les teneurs en composés antioxydants *in vitro*, en mesurant la quantité de polyphénols totaux (PPT) ainsi que la capacité des extraits de notre plante à piéger les radicaux libres. Puis nous avons déterminé la toxicité de nos extraits envers les cellules du sang total et les cellules Jurkat, les résultats de la cytotoxicité nous ont encouragés à poursuivre nos investigations. En effet, l'absence de toxicité à courts termes de nos extraits sur les cellules traitées (globules blanches et Jurkat), nous a incités à réaliser une cinétique sur deux heures afin de déterminer l'activité anti oxydante *in vivo* en suivant la production des espèces réactives de l'oxygène sur nos deux modèles cellulaires traités avec du phorbpol 12-myristate 13- acétate (PMA). Le PMA est un puissant agent inflammatoire à effet notoire. Puis nous avons réalisé une autre cinétique qui résume l'activité anti inflammatoire *in vivo* à courts et long terme sur les cellules Jurkat sans le PMA. L'amélioration du métabolisme du glutathion par les extraits d'AHA soutiendra la preuve d'un rôle chimio-préventif contre l'inflammation par modulation du statut redox. Avant de se lancer dans l'étude de l'activité anti-inflammatoire, nous avons fait une caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplé à un détecteur ultra-violet diode, dans le but de nous assurer que les composés extraits obtenus par notre méthode dont, les chromatogrammes, sont similaires à ceux qui ont été publiés et que nous arrivons bien à détecter tous les composés majeurs énoncés.

IV.1. Polyphenols totaux (PPT) et capacité de piégeage du radical DPPH des extraits d'*Artemisia Herba-alba*

L'activité anti oxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés redox, qui les font agir comme des agents réducteurs, donneurs d'hydrogène et

extincteurs d'oxygène singulet. Ils ont aussi un potentiel de chélation métallique (Rice-Evans et al., 1995).

L'estimation des teneurs en polyphénols totaux (PPT) a révélé que des quantités plus élevées ont été obtenues en utilisant la méthode des micro-ondes (**tableau 3**), qui ont donné environ 20% de plus par rapport à la méthode de macération. Nous avons constaté que l'eau extraie moins de polyphénols comparé aux solvants organiques dans les deux méthodes d'extraction.

Nous avons observé dans l'extraction assistée par micro-ondes que la valeur la plus élevée a été observée avec l'éthanol avec une teneur de 177.32 ± 0.007 mg GAE/g poids sec, suivie par l'acétone (176.14 ± 0.031 mg GAE/g poids sec) et le méthanol (167.47 ± 0.005 mg GAE/g poids sec) nous remarquons bien ici qu'ils contiennent les mêmes quantités de polyphénols totaux. Il est à noter que la combinaison de différents solvants n'a pas amélioré l'extraction des polyphénols dans les deux modes d'extraction comme le montre le **Tableau 3**.

Dans la méthode de macération que l'extrait d'acétone contenait la plus grande quantité de PPT (150.42 ± 0.43 mg GAE/g poids sec) suivi des extraits de méthanol (140.09 ± 0.010 mg GAE/g poids sec) et d'éthanol (139.31 ± 0.010 mg GAE/g poids sec).

Tableau 3 : Polyphénols totaux (PPT) des extraits de la plante *Artemisia herba-alba* obtenus par la méthode d'extraction par solvants assistée aux micro-ondes et par la méthode de macération.

Mode d'extraction	Solvants	PPT (mg GAE/g poids sec)	P-value
Micro-ondes	Eau	114.58 ± 0.022	-
	Méthanol	167.47 ± 0.005	0.001
	Ethanol	177.32 ± 0.007	0.001
	Acétone	176.14 ± 0.031	0.001
	Mélange de solvants	158.08 ± 0.005	0.001
Macération	Eau	67.45 ± 0.010	-
	Méthanol	140.09 ± 0.010	0.001
	Ethanol	139.31 ± 0.010	0.001
	Acétone	150.42 ± 0.43	0.001
	Mélange de solvants	131.53 ± 0.005	0.001

Dans le but d'évaluer la relation entre les teneurs en polyphénols totaux et les capacités anti-oxydantes *in vitro* des extraits d'AHA, nous avons utilisé la méthode des radicaux libres DPPH pour estimer les capacités de piégeage des radicaux des extraits d'AHA. De même avec les évaluations des PPT, les extraits d'acétone, d'éthanol et de méthanol ont présenté des capacités anti-oxydantes les plus élevées dans les deux modes d'extraction, attestées par leurs valeurs de IC₅₀ inférieures (**Tableau 4**). L'extrait d'AHA obtenu avec le solvant acétone micro-ondes a le pouvoir piégeur le plus élevé avec une teneur de (18.64 ± 5.91 µg/ml) suivi du méthanol micro-ondes (19.25 ± 2.62 µg/ml) et de l'éthanol micro-ondes (19.25 ± 2.62 µg/ml) (**tableau 4**).

Là encore, aucune amélioration des capacités anti-oxydantes n'a été observée pour les extraits avec le mélange de solvants. Les extraits obtenus avec de l'eau quant à eux présentent les activités anti-oxydantes les plus faibles dans les deux méthodes d'extraction (**tableaux 3 et 4**), mais qui ne restent tout de même non négligeables.

Une bonne corrélation a été observée entre les PPT et les effets de piégeage des radicaux libres des extraits étudiés ($R^2 = 0,804$) et indiqué de manière similaire par (Singleton et al., 1999). Les propriétés de piégeage des radicaux libres observées *in vitro* peuvent être principalement attribuées à ses constituants phénoliques comme le suggère la corrélation substantielle entre les activités de piégeage des PPT et du DPPH des extraits étudiés.

Tableau 4 : Teste du piégeage du radical DPPH des extraits de la plante *Artemisia herba-alba* obtenus par la méthode d'extraction par solvants assistée aux micro-ondes et par la méthode de macération.

Mode d'extraction	Solvants	IC50 (µg/ml)	P-value
Micro-ondes	Eau	38.14 ± 3.71	-
	Méthanol	19.25 ± 2.62	0.002
	Ethanol	20.50 ± 4.73	0.007
	Acétone	18.64 ± 5.91	0.008
	Mélange de solvants	25.85 ± 3.60	0.015
Macération	Eau	114.52 ± 8.42	-
	Méthanol	30.16 ± 3.23	0.001
	Ethanol	32.95 ± 5.9	0.001

Acétone	23.12 ± 3.29	0.001
Mélange de solvants	26.82 ± 4.21	0.001

Nos résultats sont cohérent et corroborent plusieurs travaux antérieures (Abu-Darwish et al., 2015; Khlifi et al., 2013; Messaoudene et al., 2011). Ici nous rapportons que les teneurs des polyphénols totaux des extraits d'*Artemisia herba-alba* étaient légèrement plus élevées que celles qui ont été précédemment rapportées: PPT = 123,95 g GAE/kg poids sec (Khlifi et al., 2013), PPT = 87,5 mg GAE / g poids sec (Bourgou et al., 2017) et PPT = 13,06 ± 0,40 mg GAE/g poids sec (Djeridane et al., 2006). Le choix du solvant et de la méthode d'extraction reste un point déterminant mais ce ne sont pas les seuls paramètres qui peuvent affecter le rendement phénolique. En effet, les conditions climatiques (températures chaudes, forte exposition solaire, sécheresse, courte saison de croissance) peuvent être à l'origine de l'augmentation de la production phénolique (Djeridane et al., 2006).

Nous avons conclu que les polyphénols des extraits AHA sont de puissants agents réducteurs, agissant comme des barrières contre l'initiation et la propagation des radicaux libres de plusieurs catégories, ce qui les rend fort intéressant pour des investigations plus approfondies.

Après avoir déterminé les extraits qui présentaient les propriétés de piégeage des radicaux libres ainsi que les teneurs en polyphénols totaux les plus élevées, qui sont le méthanol et l'acétone, dans les deux méthodes d'extraction micro-onde et macération, nous avons décidé de concentrer nos évaluations et de continuer nos expériences sur la base de ces deux extraits.

IV.2. Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits d'*Artemisia herba-alba* contre les cellules cancéreuse Jurkat et cellules du sang total saines (WBCs)

Ces dernières années, les substances bioactives d'origines végétales capables d'inhiber sélectivement la croissance des cellules tumorales a fait l'objet d'une attention considérable dans les approches de chimio-prévention du cancer (Jang et al., 2005). Dans notre modèle biologique nous voulons s'assurer que la toxicité des extraits AHA n'est pas critique au point de causer une inhibition prépondérante de la croissance des cellules cancéreuses Jurkat. Nous avons évalué la toxicité des différents extraits et leurs effets protecteurs contre

le stress oxydatif dans les cellules sanguines blanches humaines (globules blanc, WBCs) qui regroupe les monocytes, lymphocytes et les cellules polymorphonucléaires et dans la lignée leucémique (cancer du sang) Jurkat. Nous avons exposé les cellules à différentes concentrations d'extraits méthanoliques et acétoniques d'AHA, seuls ou en présence du phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), un inducteur de l'inflammation et du stress oxydatif, jusqu'à 2 heures de post-traitement. Aucun extrait d'AHA, obtenus à partir des deux modes d'extraction (macération et micro-ondes), seuls et en combinaison avec le PMA n'a affecté la viabilité cellulaire des cellules du sang total (WBCs) (**Figure 8**).

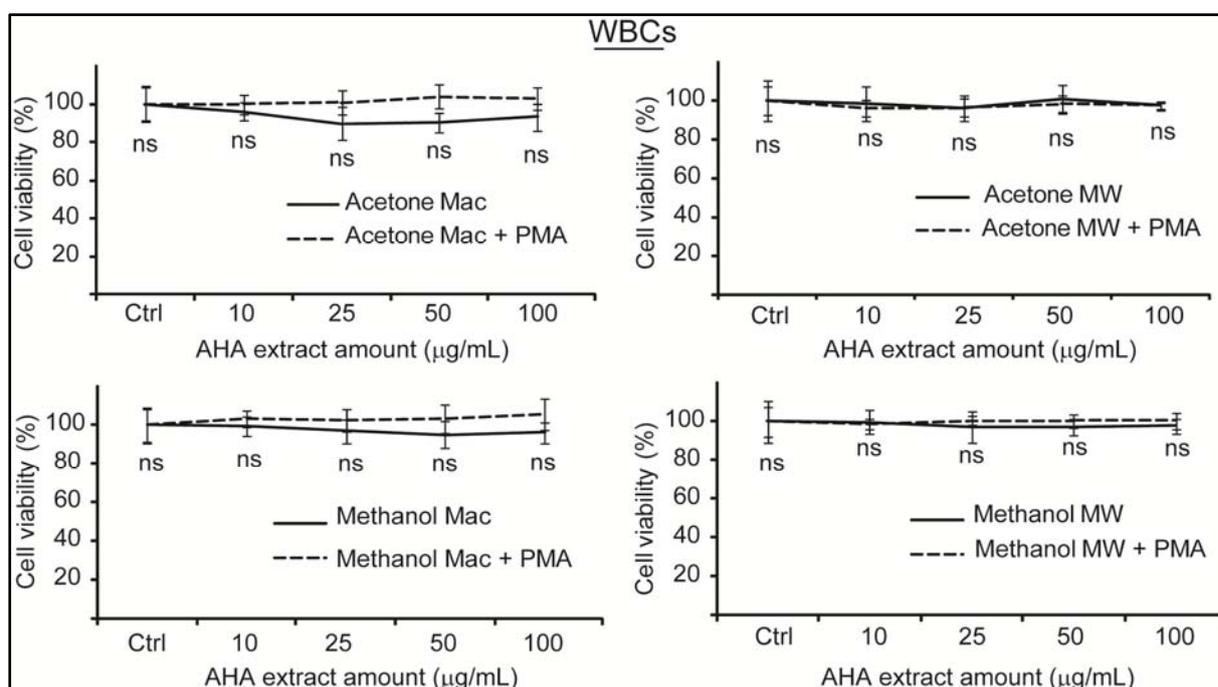


Figure8 : Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits d'*Artemisia herba-alba* Sur les cellules du sang total (WBCs) traitées par le PMA

Cependant, nous avons observé un effet synergique modéré dans la réduction de la viabilité cellulaire d'environ 20%, tout en incubant des cellules Jurkat avec des extraits d'AHA et du PMA, suggérant des effets coopératifs dans l'induction du stress oxydatif se produisant au début (**Figure9**).

Nous avons apprécié l'absence de cytotoxicité dans les PBMCs contrairement à la lignée leucémique Jurkat, qui a montré clairement une réduction de la croissance cellulaire, comme le montre nos résultats sur la **Figure 9**. Nos extraits se sont avérés légèrement toxiques pour les cellules Jurkat, en effet la réduction de la viabilité cellulaire a été remarqué et ce avec les deux extraits et les deux méthodes d'extraction utilisées. De manière

concordante, dans d'autres cellules malignes, les extraits d'AHA utilisés comme huiles essentielles d'AHA ont induits des dommages de l'ADN (Bakkali et al., 2005). Il a aussi été rapporté par une étude contre le cancer du côlon que les extraits éthanolique de l'AHA avaient des effets anticancéreux (Lupidi et al., 2011), testés sur la lignée cellulaire (HCT116). Il a été rapporté par (Khlifi et al., 2013) que les extraits d'AHA avait un effet anticancéreux testé sur des cellules leucémique de types (RT112) (Hep2) et (K562). Les résultats obtenus par (Tilaoui et al., 2015) affirment que les huiles essentielles d'AHA sont toxiques contre les cellules cancéreuses (B815) et (BSR), par contre ils n'ont aucun effet sur les cellules du sang total (WBCs). Nos résultats suggèrent un effet anti-tumoral des extraits d'AHA.

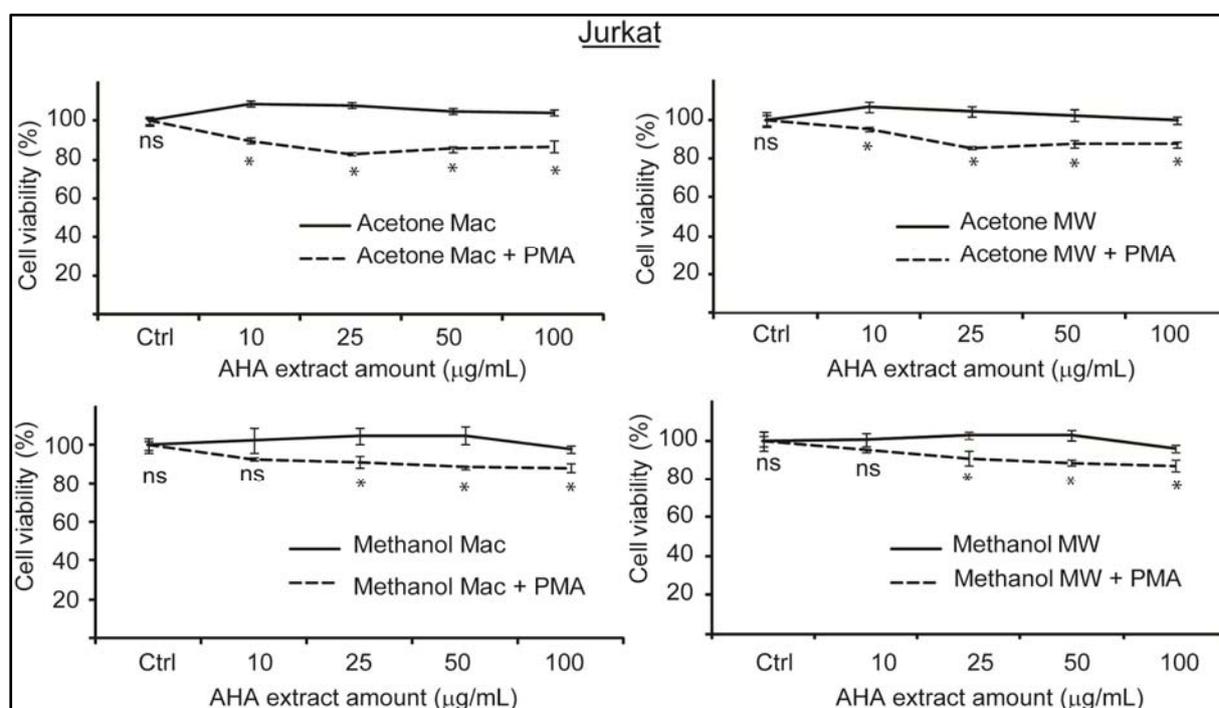


Figure 9 : Evaluation de l'effet cytotoxique des extraits d'*Artemisia herba-alba* sur les cellules Jurkat traitées par le PMA

IV.3. Extraits d'*Artemisia herba-alba*, inhibiteurs de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Nous avons mesuré la production d'espèces réactives de l'oxygène en utilisant la dihydrorhodamine 123 dans des globules blancs (WBCs) et sur la lignée cellulaire Jurkat. En accord avec les résultats de la cytotoxicité obtenus à l'aide d'extraits de PMA et d'AHA et pour tester de la même manière l'inhibition des ERO à l'aide d'extraits d'AHA en présence de PMA, nous avons mesuré les niveaux des ERO en fonction du temps sous forme de cinétique (jusqu'à deux heures d'incubation) pour suivre les ERO intrinsèques des capacités inhibitrices des extraits d'AHA. Encore une fois, nous avons sélectionné des extraits de méthanol et d'acétone pour les tests en fonction de leurs niveaux élevés de PPT. Les méthodes de macération et d'extraction par micro-ondes ont été testées en parallèle. Nous avons utilisé la même plage de concentration des extraits d'AHA de 10, 25, 50 et 100 µg/mL avec l'échantillon contrôle non-traité, afin de comparer tous les résultats en parallèle.

Les globules blancs (WBCs) incubés avec du PMA ont produit une forte induction des niveaux des ERO par rapport aux cellules non traitées, les niveaux des ERO étant induits en douceur après un pic immédiat de PMA. Les niveaux des ERO dans les cellules traitées uniquement avec le PMA se sont élevés à 7 fois par rapport au niveau de base en fin de cinétique (2 heures). Nous avons remarqué un fait intéressant, l'incubation des globules blancs avec des extraits d'acétone ou de méthanol en présence de PMA a retardé l'induction et la réduction de la production des espèces réactives de l'oxygène (**Figure 10**). Plus important les extraits obtenus avec les deux méthodes ou avec les deux solvants avait montré d'une manière très claire que les niveaux des ERO inhibés sont proportionnellement et inversement corrélés avec la quantité d'extrait incubé. Par contre les ERO n'atteignent jamais un état de saturation sous forme de plateau (**Figure 10**).

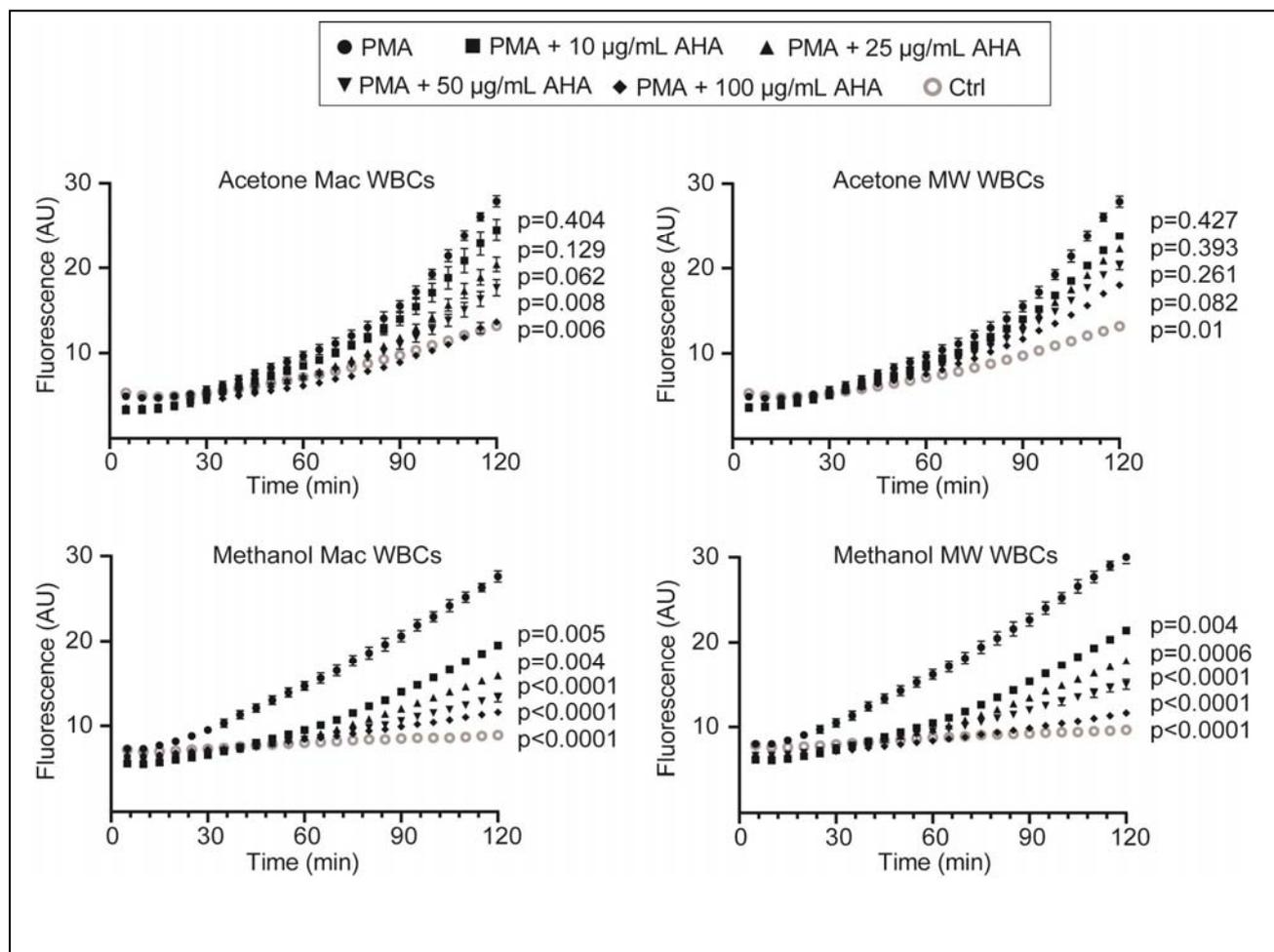


Figure 10 : Pouvoir inhibiteur des espèces réactives de l'oxygène des cellules du sang total

Nos résultats sont facilement interprétables par les valeurs des tests statistiques de comparaisons entre chaque incubation. Les valeurs des P-value sont calculées entre chaque condition d'incubation par rapport au PMA seul (**Figure 10**). Ces valeurs indiquent une décroissance de P-value = 0.4 du PMA avec 10 µg/mL, jusqu'à atteindre le niveau significatif P-value < 0.05 avec l'extrait le plus concentré 100 µg/mL. Cette tendance est similaire avec tous les extraits des solvants et les deux méthodes d'extractions.

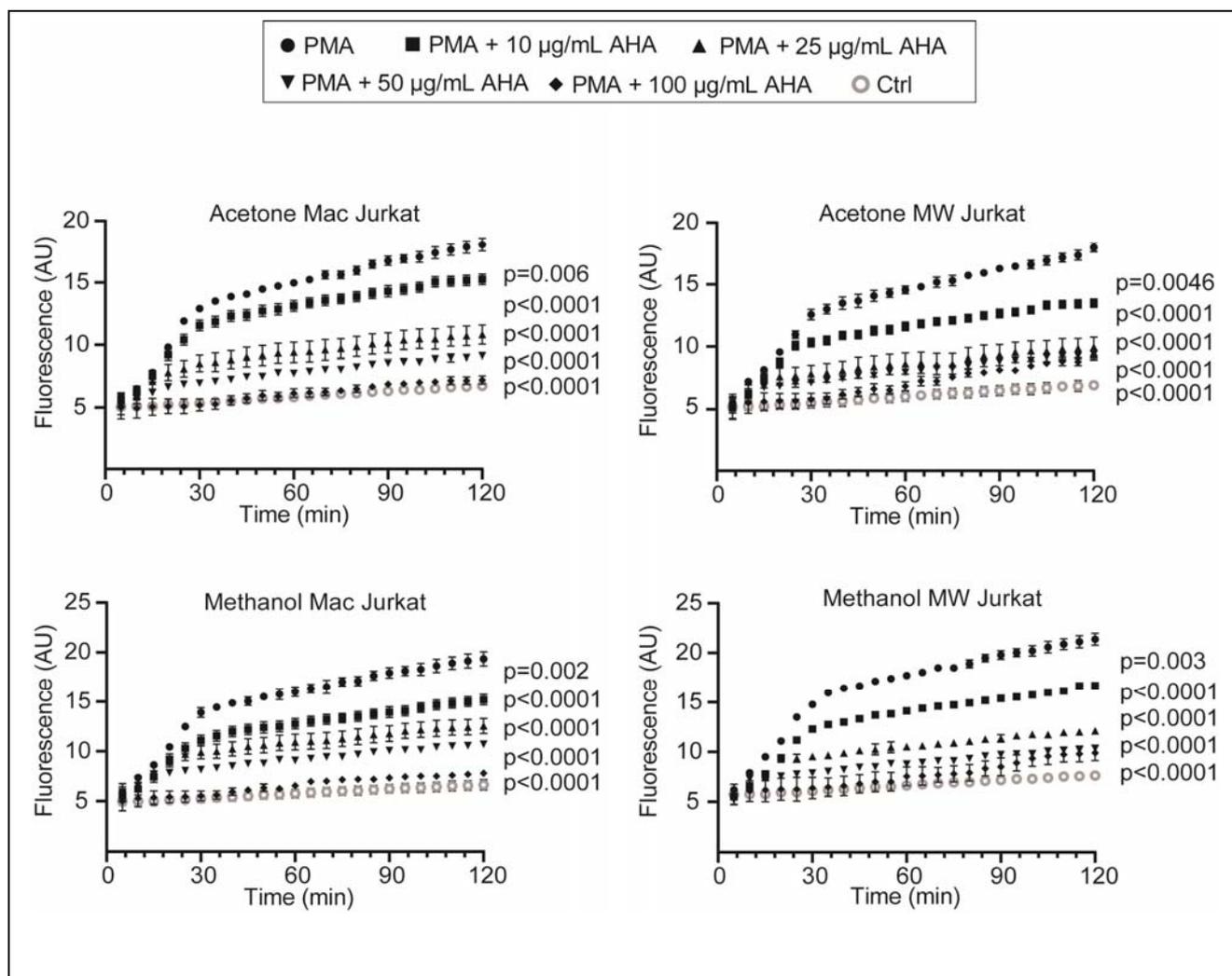


Figure 11 : Pouvoir inhibiteur des espèces réactives de l’oxygène de la lignée cellulaire cancéreuse Jurkat

Dans les deux types de cellules WBCs et Jurkat, l'effet inhibiteur était dépendant de la concentration des extraits d'AHA. De plus, le taux d'inhibition des ERO ne différait pas entre les modes de macération et d'extraction par micro-ondes (**Figure 10 et 11**). Par rapport aux Jurkat, la tendance des courbes d'inhibition des ERO par les extraits AHA est la même que celle observée avec les WBCs. Par contre la cinétique d'induction diffère. Les Jurkat réagissent d'une manière plus brutale et plus rapide aux PMA. Le niveau des ERO atteints un plateau

après juste 30 minutes. Ceci en observant les niveaux des ERO induits par le PMA seul, on note que leurs niveaux chez les Jurkat est inférieure de 30% comparés à ceux des WBCs. Nous avons conclu que le modèle des Jurkat reproduit d'une manière assez similaire la réponse au PMA comparées aux WBCs du sang total. Ainsi, nous avons décidé d'utiliser les Jurkat pour l'étude du rôle du statut redox dans l'inflammation induite par le PMA et les capacités des extraits d'AHA à mobiliser les thiols cellulaires pour lutter contre les effets néfastes de l'inflammation.

Dans nos modèles cellulaires, les extraits d'AHA sont capables de réduire et de bloquer totalement la production des ERO à des doses élevées, suggérant des propriétés bénéfiques de la consommation d'AHA dans la prévention des syndromes inflammatoires. Ces observations sont en accord avec l'utilisation traditionnelle de l'AHA en médecine traditionnelle, dans le traitement de la bronchite et des infections cutanées locales. Des infusions d'*Artemisia herba-alba* ont été utilisées pour traiter la toux, les douleurs intestinales, le diabète et les inflammations (Khelifi et al., 2013).

IV.4. Mise en évidence de l'effet anti-inflammatoire des extraits d'*Artemisia herba-albavia* la mobilisation du métabolisme du glutathion

IV.4.1. Caractérisation des composés présents dans les extraits méthanoliques de l'AHA

Avant de se lancer dans l'étude anti-inflammatoire des extraits d'*Artemisia herba-alba*, par la modulation du statut redox cellulaire, nous avons effectué une caractérisation des extraits méthanoliques par chromatographie liquide à haute performance lié à un détecteur ultra-violet diode (HPLC-UV diode). Nous voulons nous assurer que nos chromatogrammes sont similaire à ceux qui sont publiés et arrivent bien à détecter tout les composés majeurs énoncés (Bourgou et al., 2017). Ainsi essayer de détecter, parmi ces composés, s'il y a une ou des molécules à effet anti-inflammatoire, afin d'appuyer encore plus nos preuves que les extraits d'AHA réduirait en effet l'inflammation. Effectivement, comme montré sur la **Figure 12**. L'identification des principaux composants phénoliques d'*Artemisia herba-alba* a été

confirmée en comparant leurs temps de rétention et leurs spectres UV avec ceux d'étalons commerciaux authentiques.

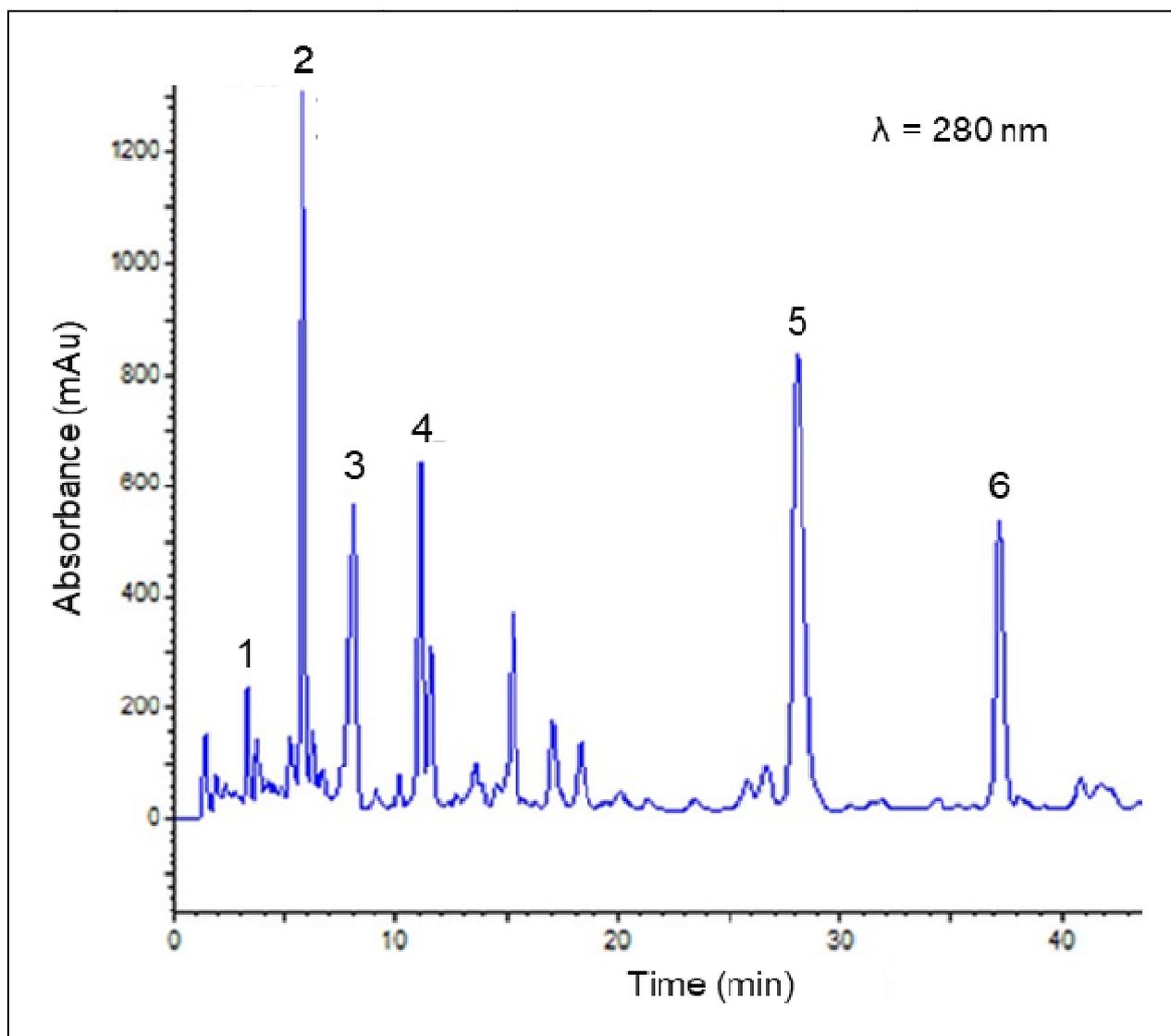
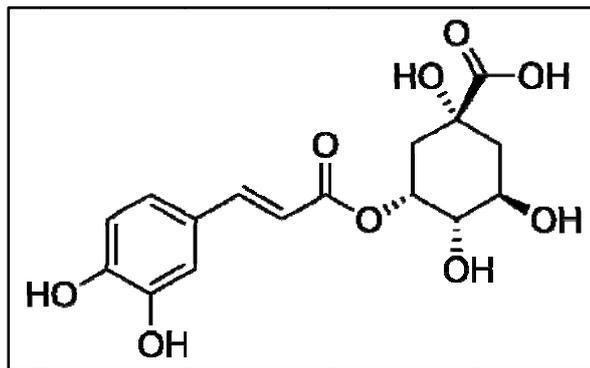


Figure 12 : Profile HPLC-UV de l'extrait méthanolique d' *Artemisia herba-alba* obtenu par macération. 1. acide néochlorogénique; 2. acide chlorogénique; 3. apigénin 6,8-diglycoside ; 4. schaftoside; 5. acide 3,5-dicaffeoylquinique ; et 6. acide 4,5-dicaffeoylquinique.

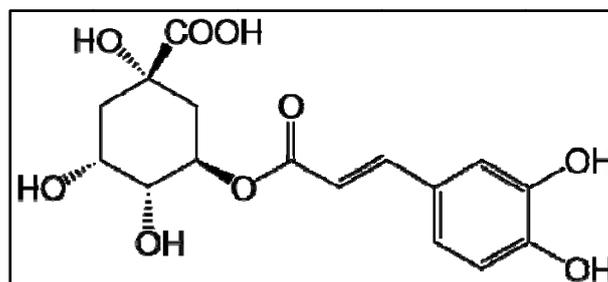
Les pics obtenus représentent :

- + **Pic 1:** Acide néochlorogénique est l'isomère de l'acide chlorogénique, c'est un composé phénolique à effet antioxydant et anti-inflammatoire (Gao et al., 2020; Kim et al., 2015).



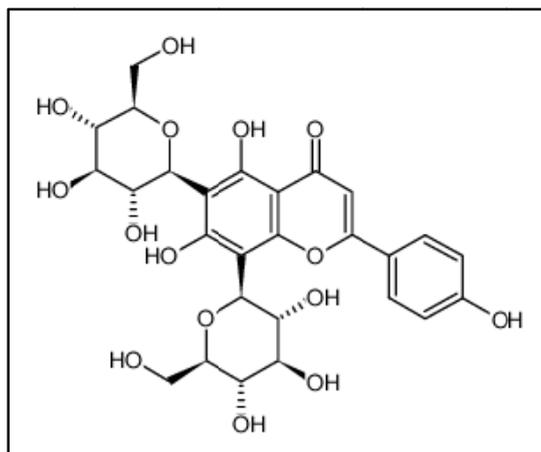
Structure chimique de l'acide néochlorogénique

- + **Pic 2:** Acide chlorogénique est l'un des principaux composés phénoliques du café, également trouvé chez certaines plantes où on peut l'isoler dans les feuilles ou fruits. Dans notre alimentation, le café est la source principale d'acide chlorogénique, il a un effet antioxydant et anti-inflammatoire (Chen et al., 2021; Farah and Duarte, 2015).



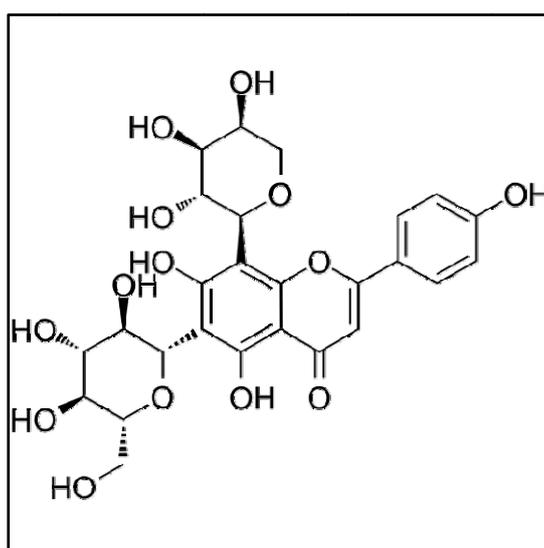
Structure chimique de l'acide chlorogénique

- + **Pic 3:** Apigenin 6,8-diglucoside ou vicenin 2 est un polyphénol de type flavonoïde. Cette molécule a un effet anti-inflammatoire (Kang et al., 2015; Lee and Bae, 2016; Yin et al., 2019).



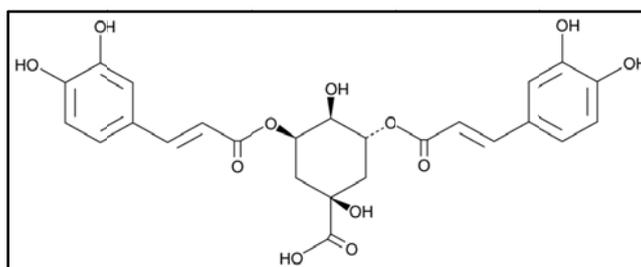
Structure chimique de l'apigenin 6,8-diglucoside (Vicenin 2)

✚ **Pic 4 :** Schaftoside est un flavonoïde présent dans une variété de plantes médicinales chinoises, telles que *Eleusine indica*. Le schaftoside inhibe l'expression de TLR4 et Myd88 (dans l'état normal l'activation de la TLR4 et Myd88 conduit à une voie de signalisation intracellulaire et à la production de cytokines inflammatoires, responsables de l'activation du système immunitaire inné). In vivo Le schaftoside inhibe trois activités enzymatiques pro-inflammatoires : la phospholipase A2 sécrétoire (sPLA2), la lipoxygénase (LOX) et la cyclooxygénase 2 (COX-2). Le Schaftoside inhibe également l'ARNm et les expressions protéiques des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α et IL-6) (Messoudene et al., 2011).



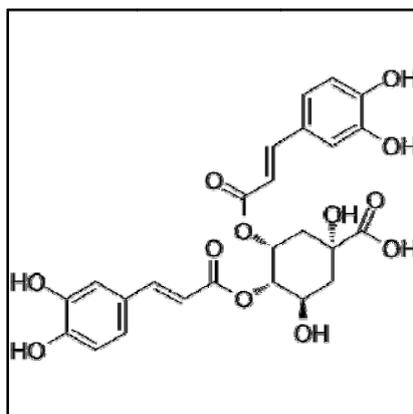
Structure chimique du schaftoside

- ✚ **Pic 5** : Acide 3,5-dicaffeoylquinique ou cynarine est un antioxydant de la classe des polyphénols, bio synthétisé par certains végétaux, dérivé de l'acide chlorogénique. Chimiquement, c'est un ester formé d'acide quinique et de deux unités d'acide caféique(Wei and Tanokura, 2015).



Structure chimique de l'acide 3,5-dicaffeoylquinique

- ✚ **Pic 6** : Acide 4,5-dicaffeoylquinique ou acide isochlorogénique est un produit naturel possédant de puissants effets hépato protecteurs (Wang et al., 2016).



Structure chimique de l'acide 4,5-dicaffeoylquinique

IV.4.2. Caractérisation de la réponse cellulaire via la mobilisation du métabolisme du glutathion

Les réponses inflammatoires sont cruciales pour la défense de l'hôte et sont soumises à un système de contrôle complexe, visant à prévenir les dommages tissulaires et les conséquences dangereuses. Étant donné que de nombreuses maladies inflammatoires sont caractérisées par un afflux de lymphocytes et de leucocytes (WBCs) dans les tissus enflammés, il existe un vif intérêt pour rechercher et tester des composés susceptibles de moduler ces processus (Sartori et al., 2021). Dans notre modèle nous avons voulu comprendre comment les extraits de la plante AHA peuvent moduler le statut redox *via* la mobilisation du glutathion. Afin de comprendre le rôle des extraits d'AHA dans la réduction de l'inflammation liée au PMA, nous avons étudié la modulation du métabolisme du glutathion à des moments précoces et tardifs sans PMA. Le comportement similaire des globules blancs (WBCs) et des cellules Jurkat dans l'inhibition des espèces réactives de l'oxygène en présence d'extraits d'AHA nous a incités à utiliser des cellules Jurkat pour étudier la cinétique de la réponse anti oxydante suite à l'exposition aux extraits d'AHA, en raison de la difficulté à maintenir les globules blancs en culture. Nous avons suivi la réponse cellulaire jusqu'à 72 heures après le traitement avec de l'extrait d'AHA sans aucun post-traitement au PMA.

Les paramètres du métabolisme du glutathion ont été analysés par :

- ✚ Les niveaux de glutathion (GSH) et l'activité enzymatique de la glutathion réductase (GR) pour l'homéostasie du statut redox ;
- ✚ Analyse des activités enzymatiques de la glutathion S-transférase (GST), de la glutathion peroxydase (GPx);
- ✚ Thiol-protéines libres totales pour évaluer les capacités cellulaires de détoxification des ERO.

Dans un premier temps nous avons évalué le métabolisme du glutathion dans la lignée cellulaire Jurkat traitée avec différentes concentrations d'extraits d'*Artemisia herba-alba* (AHA), allant de 0, 10, 25, 50 et 100 µg/mL, pendant une courte période de 1 heure et 6 heures de post-traitements. Des extraits de méthanol et d'acétone provenant des modes d'extractions par macération et micro-ondes ont été évalués en conséquence. Chaque point de mesures

représente la moyenne des résultats de trois répétitions \pm l'écart type (SD), normalisées par rapport au contenu total en protéines. La signification statistique est représentée par des valeurs P indiquées comme non significatives $p > 0,05$ (ns), ou significatives (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), calculées par rapport aux cellules non traitées par AHA, considérées comme la condition de contrôle (AHA, 0 $\mu\text{g/mL}$).

Un fait très intéressant, après l'incubation des cellules Jurkat avec des extraits de AHA obtenus par macération dans du méthanol à différentes concentrations, nous avons remarqué des niveaux de GSH élevés après 1 heure de post-traitements (**Figure 13**). L'induction du GSH atteint son niveau maximal avec une concentration à proche de 30 $\mu\text{mol/g}$ de protéines induite à 25 $\mu\text{g/mL}$ de l'extrait AHA, un niveau 3 fois plus supérieure au niveau normal dans les cellules non-traitées. La tendance haussière du niveau du GSH se confirme après 6 heures d'incubation pour atteindre l'équivalent de 30 $\mu\text{mol/g}$ de protéines (**Figure 14**). Le métabolisme du statut redox cellulaire accompagne le recyclage du GSSG par la glutathion réductase, ce qui assure des niveaux hauts du GSH. En plus le maintien de l'intégrité cellulaire dans ce cas est assuré par la mobilisation des enzymes de détoxification comme la GPx et la GST qui utilisent le GSH pour parer à des radicaux libres.

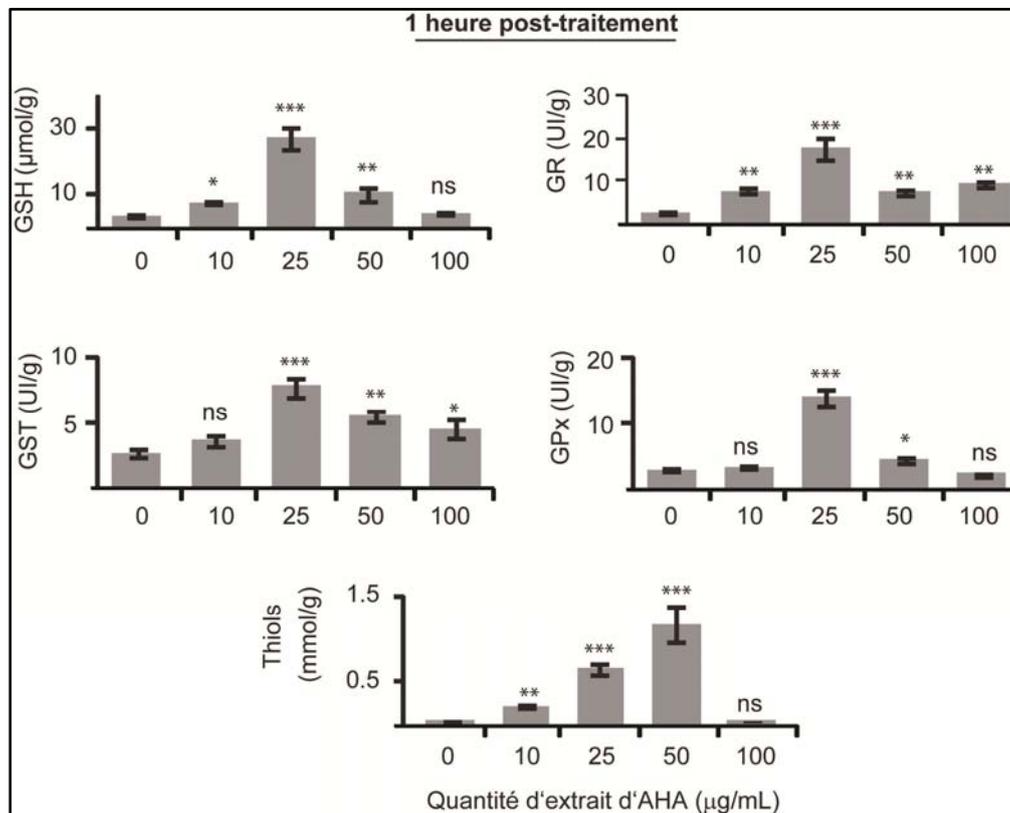


Figure 13 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par macération au méthanol ; à 1 heure de post-traitements.

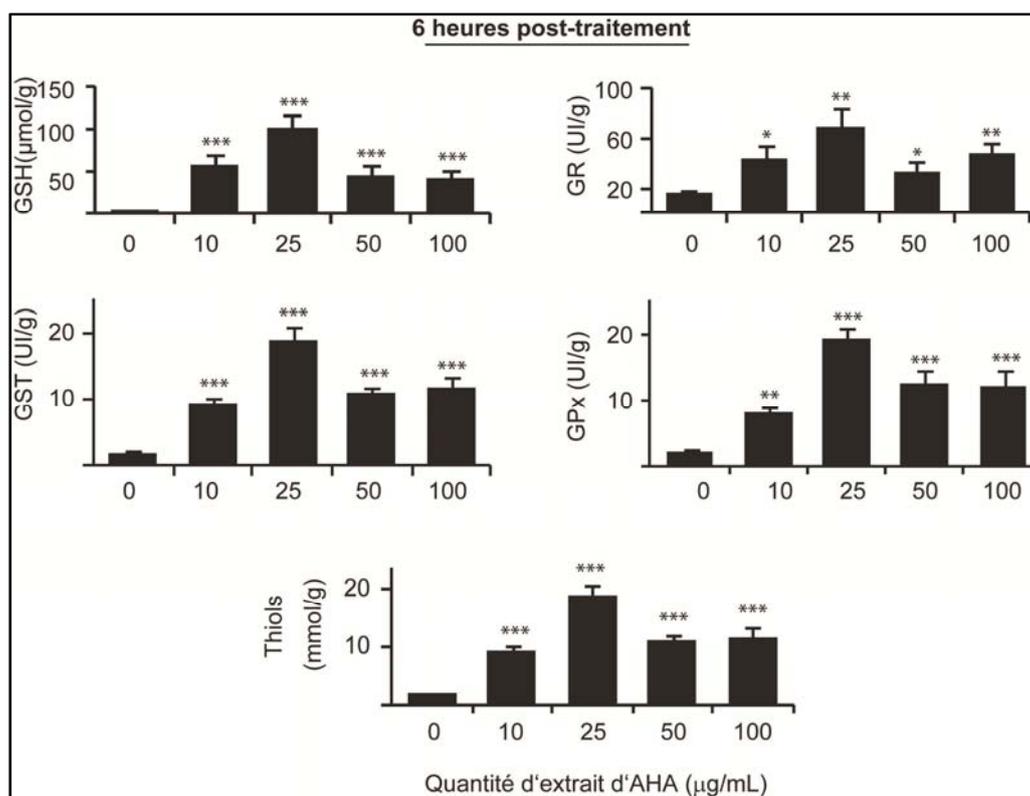


Figure 14 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par macération au méthanol ;à 6 heures de post-traitements

L'augmentation modérée des thiols libres indique un environnement cellulaire réduit, nullement affecté par un stress oxydant quelconque. Par contre, le fait que nos extraits induisent la formation du glutathion nous laisse à comprendre qu'il y a eu induction d'un stress cellulaire, mais reste maîtrisable. Cependant, les paramètres du métabolisme du glutathion n'étaient pas entièrement corrélés avec les quantités d'extraits de méthanol AHA ajoutées aux cellules.

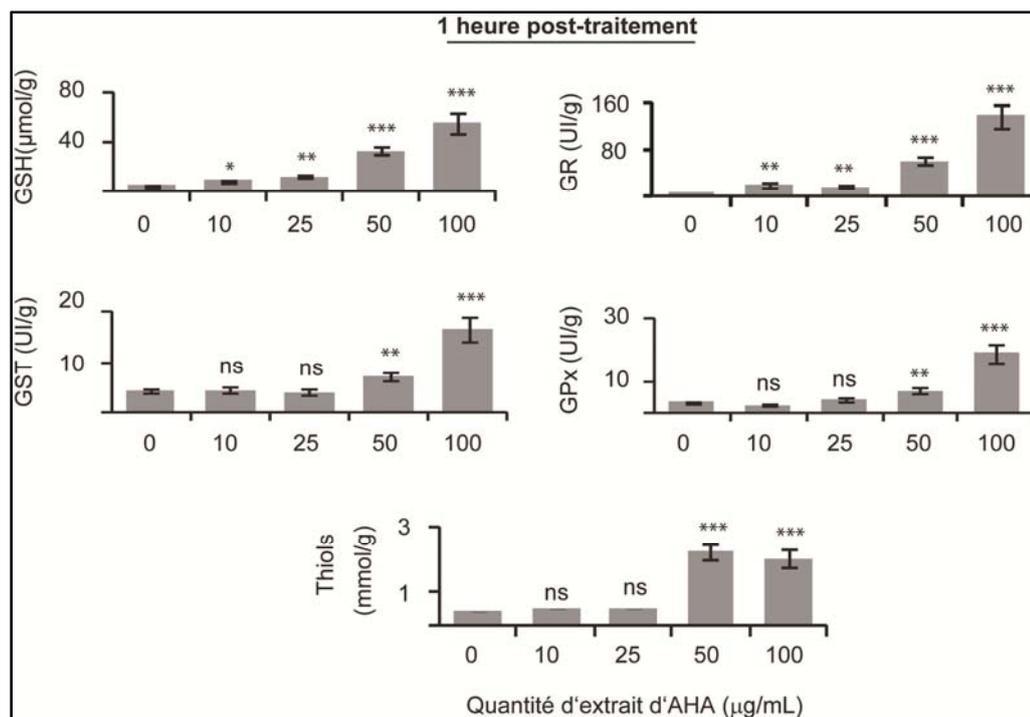


Figure 15 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par macération à l'acétone ; à 1 heure de post-traitement.

Parallèlement aux extraits obtenus avec le méthanol, nous avons aussi incubé les cellules Jurkat avec les extraits AHA obtenus par macération dans l'acétone. Les extraits acétoniques eux aussi ont induit le GSH mais la dynamique et la cinétique de l'induction, ainsi que les niveaux ne sont pas du même ordre. Par exemple, avec l'acétone à 25 µg/mL le niveau du GSH est inférieure à celui du méthanol, par contre à 100 µg/mL, il est trois fois plus élevé avec une cinétique corrélative par rapport aux concentrations d'extraits ajoutés aux cellules (**Figure 15**). L'induction des niveaux de GSH sont bien corrélés avec l'activité de la GR, renforçant le pool du glutathion réduit et les capacités détoxifiantes. La GST, la GPx et les protéines thioles libres ont suivi la même tendance d'induction pour le GSH et la GR. La concentration de 100 µg/mL est la plus efficace (**Figure 15**). Cependant, les paramètres du métabolisme du glutathion n'étaient pas entièrement corrélés avec les quantités d'extraits de méthanol AHA ajoutées aux cellules. Après six heures d'incubation, il semble qu'avec les extraits acétoniques de macération que les niveaux du GSH atteignent la saturation déjà à 10 µg/mL ce qui se traduit par un plateau d'induction stable même à 100 µg/mL (**Figure 16**).

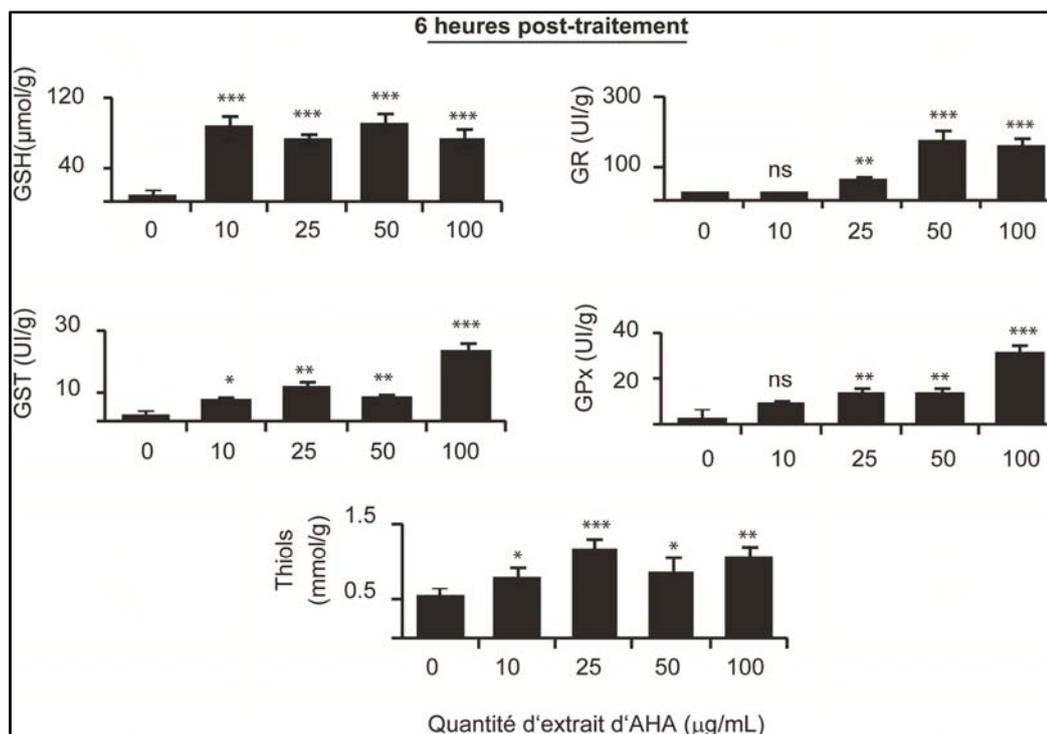


Figure 16 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par macération à l'acétone ; à 6 heures de post-traitements.

Le métabolisme du GSH suit aussi la même tendance en maintenant des niveaux de GR, GPx, GST ainsi que des thiols libres très corrélés les uns aux autres. Les activités de la GST, GPx et les teneurs en protéines thiols libres ont suivi la même tendance à la hausse à chaque concentration d'extrait, corroborant l'induction des niveaux de GSH, qui sont restés similaires aux extraits de méthanol (**Figure 15 et 16**). Il est à noter qu'après 6 heures, les extraits d'acétone dans ce cas ont eu un léger effet néfaste à des doses élevées (100 µg/mL), ce qui a modifié modérément le pool de protéines thiol libres (**Figure 16**). La concentration de 10 µg/mL était suffisante pour mobiliser une teneur égale en GSH par rapport à des concentrations plus élevées. L'écart dans les paramètres d'état redox cellulaire entre les extraits macérés au méthanol et à l'acétone pourrait s'expliquer par la différence de composition des extraits.

Après avoir confirmé le potentiel inducteur du GSH des extraits méthanoliques et acétoniques par la méthode de macération, nous avons voulu tester des extraits obtenus par micro-ondes afin de déterminer qu'elle est la méthode qui a le plus de potentiel anti-inflammatoire par une action anti-oxydante conjugué du GSH.

En tenant compte de ces différences observées auparavant, nous avons testé des extraits AHA de méthanol et d'acétone obtenus par micro-ondes pour les mêmes paramètres

cinétiques. L'analyse des niveaux de GSH et des activités de la GR a révélé que la concentration de 25 µg/mL d'extrait de méthanol induit les valeurs les plus élevées après une heure d'incubation (**Figure 17**). Ce qui corrobore parfaitement les résultats obtenus par macération, montrés en **Figure 13**. Ce qui diffère, c'est que les extraits de méthanol par micro-ondes d'AHA ont conduit à un effet de saturation de la réponse cellulaire pour tous les paramètres à six heures d'incubation à chaque concentration des extraits : 10, 25, 50 et 100 µg/mL, comparable à celui des extraits acétoniques par macération (**Figure 18**). D'une manière similaire, les extraits d'acétone aux micro-ondes ont induit une réponse cellulaire similaire à celle des extraits macérés à l'acétone à une heure avec un effet dose croissant après 6 heures, sans atteindre la saturation, pour tous les paramètres d'état redox (**Figure 19 et 20**). Ceci qui nous conduit à conclure que les extraits obtenus avec du méthanol à l'acétone par la technique d'extraction par solvant assistée aux micro-ondes étaient plus puissants pour maintenir la réponse cellulaire que les extraits obtenus par la méthode de macération. Les niveaux du GSH et les enzymes liées à son métabolisme restent relativement plus élevés dans les cellules traitées par les extraits acétoniques micro-ondes comparés aux extraits méthanoliques. Il est à noter que les niveaux du GSH induit, sont fortement élevés, ce qui suggère des synergies dans les mécanismes d'inductions ou la présence de nouvelles molécules qui sont extraites uniquement par micro-ondes. Les niveaux des thiols libres sont aussi maintenus à des niveaux relativement bas. Ce qui nous laisse penser que les extraits AHA obtenus par micro-ondes ont un effet plutôt bénéfique sur la modulation du statut redox cellulaire.

La réponse cellulaire immédiate aux extraits de l'AHA est spectaculaire, car au bout d'une heure d'incubation, la quantité cellulaire du GSH triple, indépendamment des techniques d'extractions ou du solvant utilisé. L'augmentation du GSH passe par une mobilisation complète du métabolisme des thiols, afin de palier à un stress éventuel. Cette réponse adaptée se passe dans des temps très courts, observée à une heure. Ce qui, en général, correspond à la durée d'exposition des cellules humaines aux extraits d'AHA obtenus lors d'un usage thérapeutique ou préventif.

Par la suite, nous avons posé la question, quel sera l'impact d'une longue exposition des cellules aux extraits d'AHA obtenus par les différents solvants et les deux méthodes d'extractions et quel sera l'impact sur le métabolisme du GSH, car une chute du niveau du GSH indiquerait un stress insurmontable et une toxicité accrue due à son utilisation par les enzymes GST et la GPx, responsable de la détoxification des composés métaboliques produits. En utilisant la même logique analytique, pour répondre à cette question.

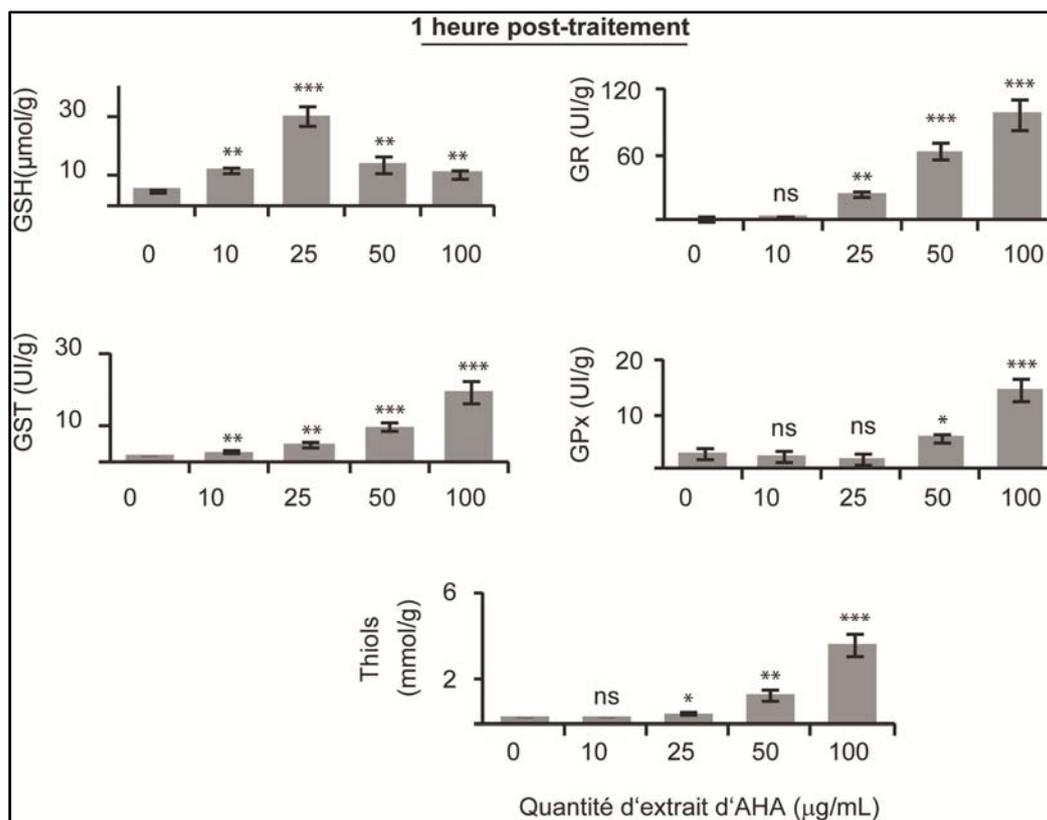


Figure 17 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par extraction au méthanol par micro-ondes; à 1 heure de post-traitements.

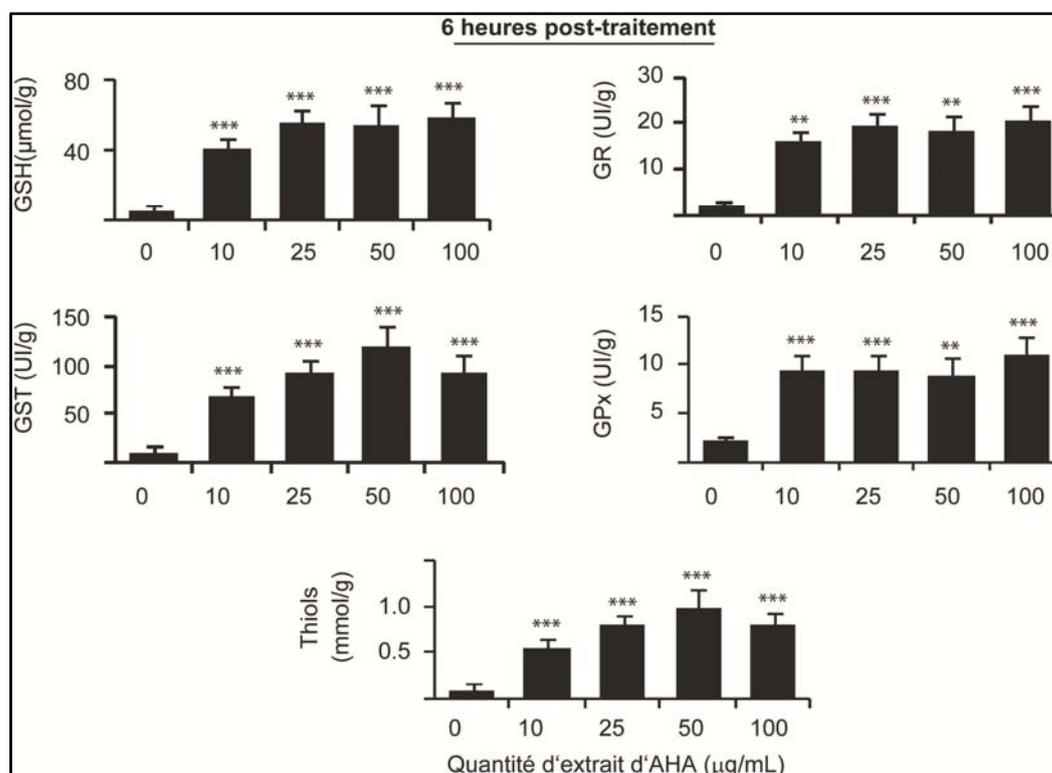


Figure 18 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par extraction au méthanol par micro-ondes; à 6 heures de post-traitements.

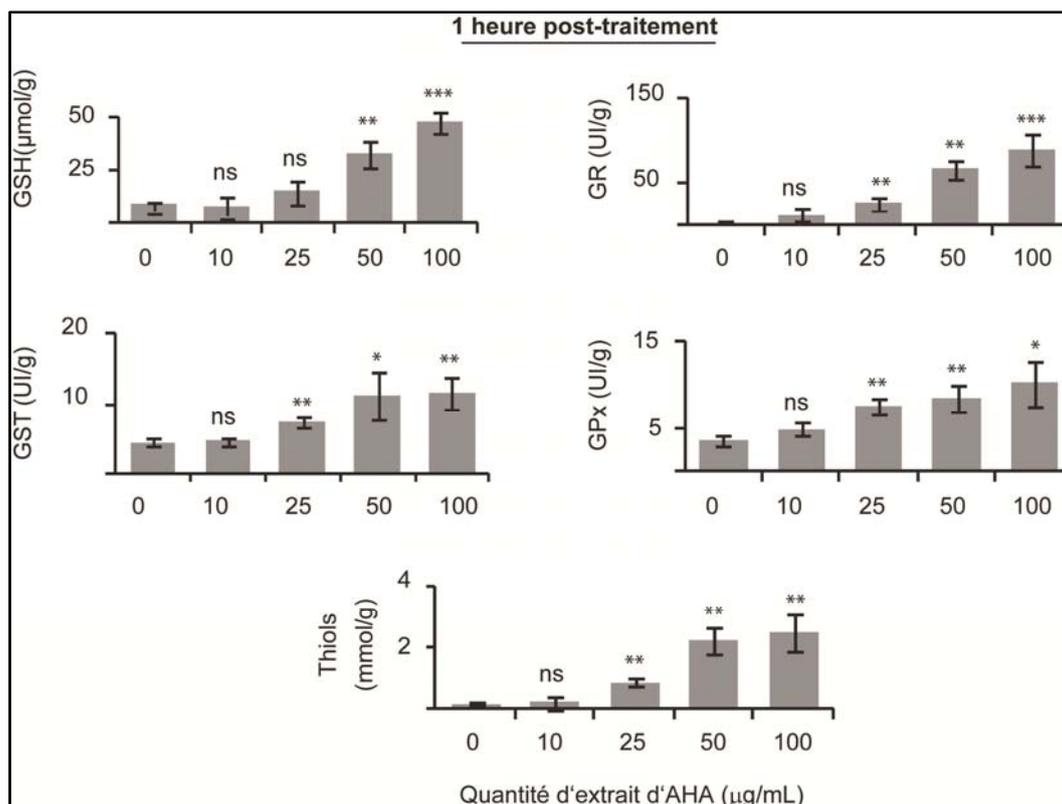


Figure 19 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par extraction à l'acétone par micro-ondes; à 1 heure de post-traitements.

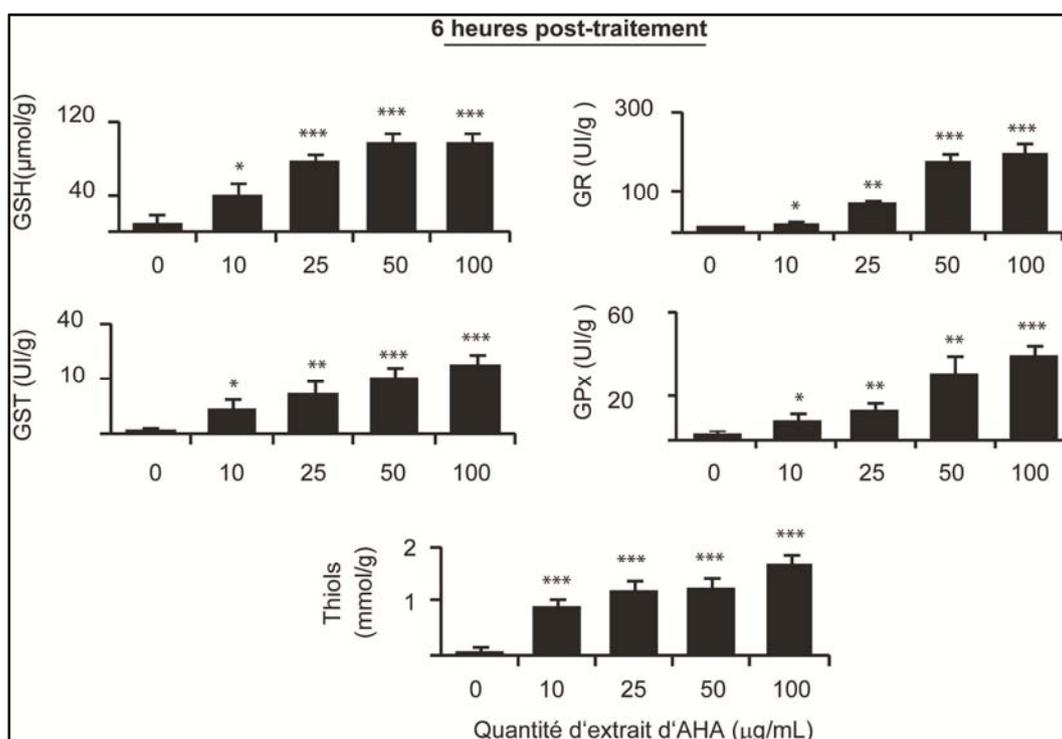


Figure 20 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'AHA obtenus par extraction à l'acétone par micro-ondes; à 6 heures de post-traitements.

Nous avons aussi évalué le métabolisme du glutathion dans la lignée cellulaire cancéreuse Jurkat traitée avec différentes concentrations d'extraits d'*Artemisia herba-alba* (AHA) pendant une période de 24 et une période plus longue de 72 heures après le traitement. Les paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits de macération méthanolique : niveau de glutathion réduit (GSH), activités enzymatiques de la glutathion réductase (GR), de la glutathion transférase (GST), de la glutathion peroxydase (GPx) et des thiols protéiques (thiols libres), à 24 heures après le traitement (barres grises) et à 72 heures après le traitement (barres noires). Nous avons effectué toutes les mesures en trois fois, et les résultats sont montrés comme des moyennes \pm l'écart type (SD), normalisées par rapport au contenu total en protéines afin d'éviter des variations dues aux nombres de cellules. La signification statistique est représentée par des valeurs P indiquées comme non significatives $p > 0,05$ (ns), ou significatives (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), calculées en utilisant des cellules non traitées par l'AHA comme contrôle (contrôle, $0 \mu\text{g/mL}$).

Avec les extraits méthanoliques en macération, nous avons mesuré une forte production de GSH qui continue à croître jusqu'à 24h, cette augmentation suit une corrélation positive avec la concentration des extraits. La concentration la plus élevée en extrait ($100 \mu\text{g/mL}$) a engendré la production de la plus haute concentration du glutathion (GSH = $40 \mu\text{mol/g}$), le glutathion réductases suit la même tendance, c'est-à-dire que la quantité augmente en fonction de la concentration (**Figure 21**). Une différence intéressante à observer est que la plus haute valeur de GST est attribuée à la plus haute concentration d'extrait ($100 \mu\text{g/mL}$), par contre celle de la GPx est attribuée à la concentration de $50 \mu\text{g/mL}$. Par contre les valeurs entre elles ne sont pas significativement différentes. Ce qui peut s'expliquer par des variations techniques qui n'affecte pas trop nos résultats et conclusions.

Les paramètres du statut redox cellulaire des cellules traitées avec des extraits méthanoliques obtenus par la technique de macération après 72 heures de post-traitement ont été mesurés afin de déterminer des effets délétères car ce genre d'exposition est souvent très rare en réalité. Les extraits macérés au méthanol stimulaient toujours la production du GSH et son recyclage de manière dose-dépendante (**Figure 22**). Les paramètres GR, GST, GPx, thiols libres ont été maintenus même après 72 heures. Les capacités détoxifiantes liées au GSH ont augmentées suivant la même tendance 24 heures après le traitement. La cinétique de la stimulation poursuivie et maintenue à travers toutes les doses d'extraits d'AHA et est restée dépendante de la dose, avant d'atteindre un plateau à 72 heures mais reste inférieure à celle de 24h (**Figure 23**). Ceci explique un effet de saturation et de stagnation de l'induction et du maintien du GSH.

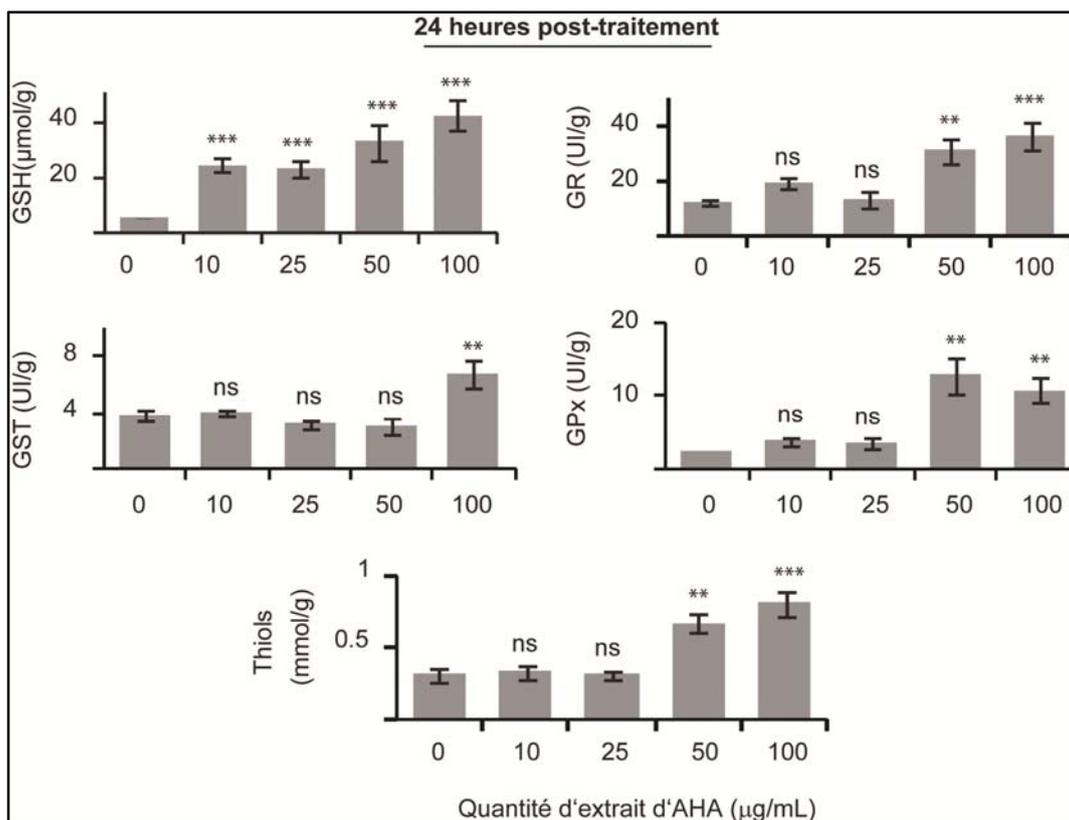


Figure 21 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits de l'AHA obtenus par macération méthanolique ; à 24 heures de post-traitements.

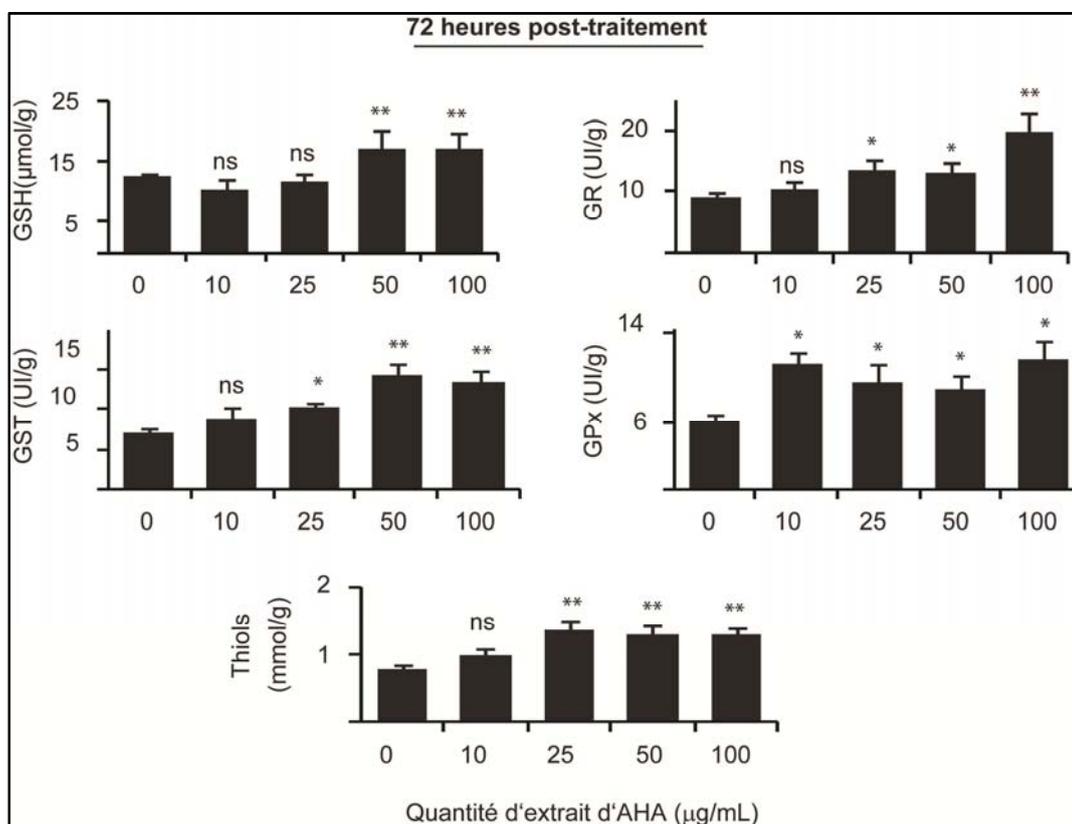


Figure 22 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits de macération méthanolique ; à 72 heures de post-traitements.

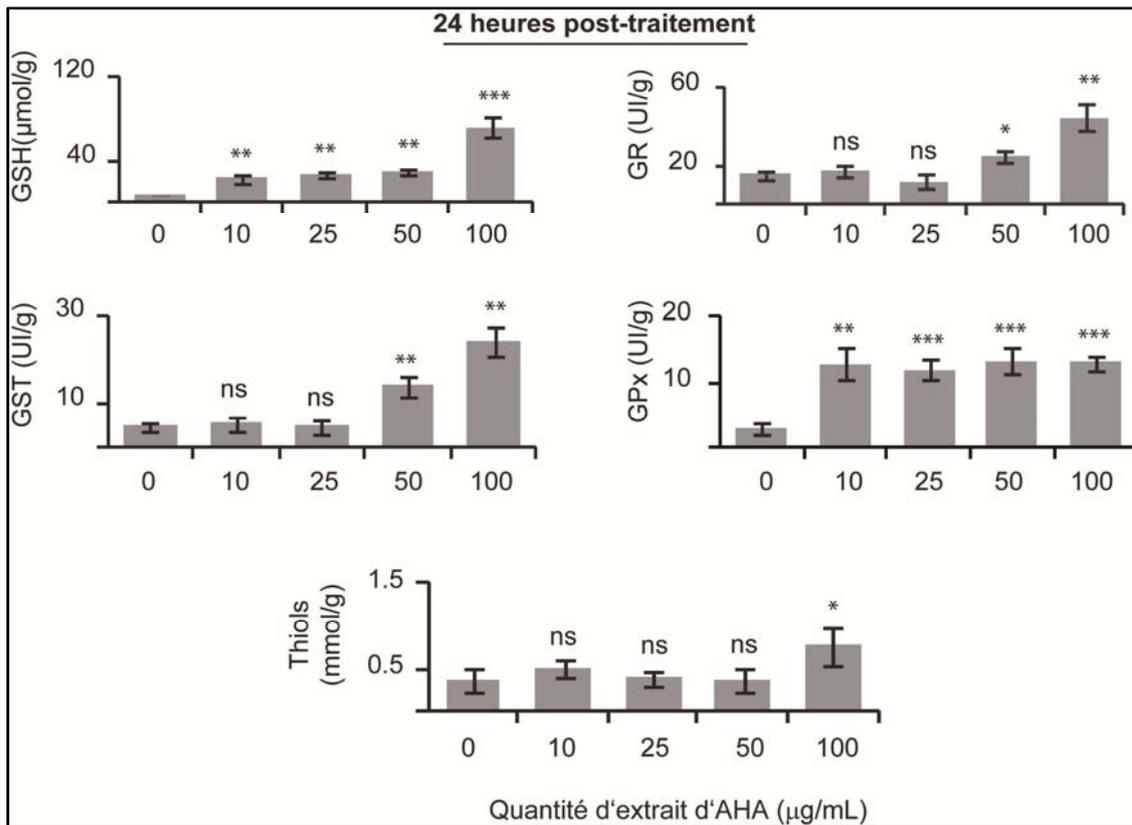


Figure 23 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'acétone macération ; à 24 heures de post-traitements.

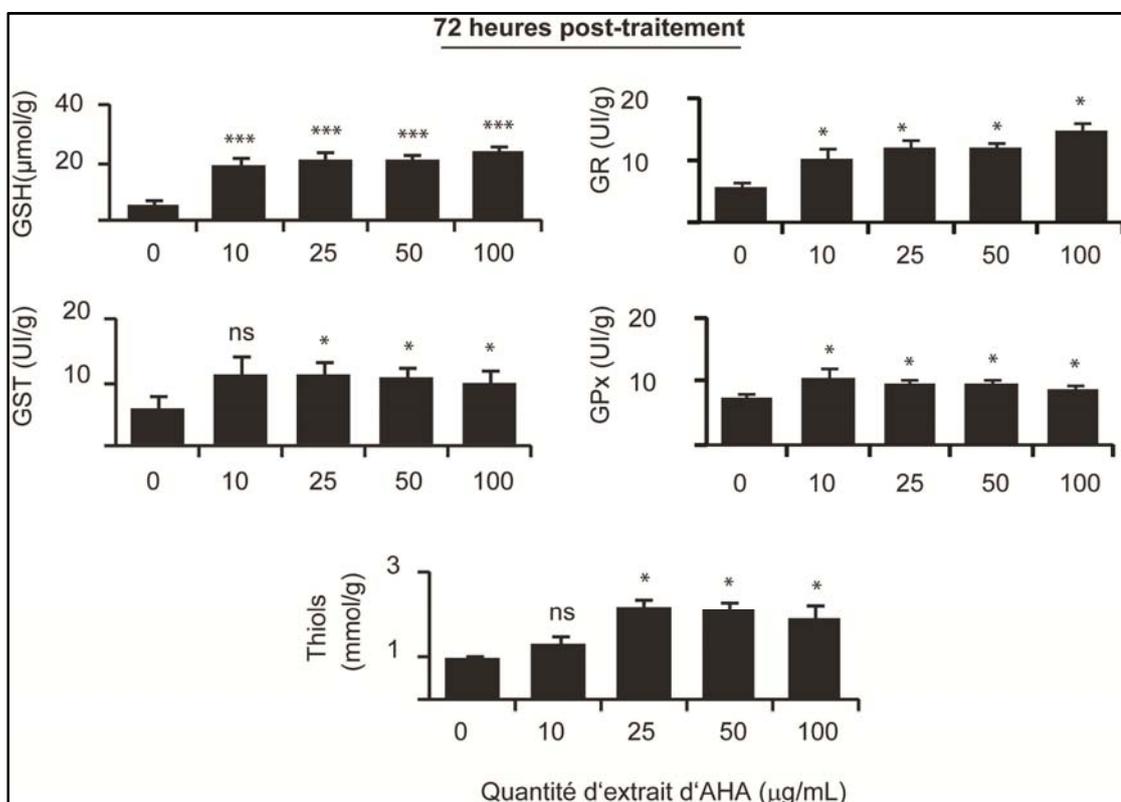


Figure 24 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'acétone macération ; à 72 heures de post-traitements.

Fait intéressant avec les extraits macérés à l'acétone, ceux-ci montrent des profils de la réponse anti-oxydante totalement différents de celle des extraits méthanoliques. En effet, les extraits acétoniques atteignent des niveaux élevés à 100 µg/mL, aux alentours de 80 mmol/g de protéines à 24 heures, ce niveau de GSH corrobore l'activation des GR, GST et GPx (**Figure 23**). Cette tendance s'atténue puis diminue pour se stabiliser après 72 heures (**Figure 24**). Après 72 heures, il semble que les cellules ont épuisées l'action des extraits sans trop de toxicité au vue des mesures des thiols libres. Pour conclure sur la macération, les extraits acétoniques de AHA ont un effet plus pertinent et semble durer dans le temps, ce qui les rends meilleurs pour moduler le métabolisme du GSH pour une action anti-inflammatoire.

Dans le même sens logique, nous avons analysé les extraits méthanoliques et acétoniques de l'AHA obtenus par la méthode micro-ondes. Nos résultats montrent que les cellules traitées avec les concentrations les plus faibles à savoir 10 µg/mL et 25 µg/mL les extraits méthanoliques ont produits les concentrations les plus élevées en GSH comparé à la macération. Le taux le plus élevé de GR, GPx, GST et Thiols ont eu la même tendance (**Figure 25**). Nous remarquons ici que les paramètres redox ont tous été maintenu après 72 heures de post-traitement. Toutes les cellules traitées aux extraits méthanoliques obtenus par extraction aux micro-ondes d'AHA ont produits des concentrations similaires de glutathion (GSH), ainsi que pour la GPx, la concentration du GPx reste inchangée avec l'augmentation de la concentration d'extraits. On observe une augmentation légère de la concentration en GST avec l'augmentation de la concentration d'extrait. Les extraits micro-ondes au méthanol ont produit une réponse anti-oxydante élevée à 24 heures et sont restés inchangés à 72 heures quelles que soient les doses utilisées (**Figure 25 et 26**). Après 72 heures, il semble aussi que la réponse anti-oxydante est sur la pente descendante (**Figure 26**). Comme prévu, les extraits d'acétone obtenus par micro-ondes ont constamment maintenu des niveaux élevés de paramètres d'état redox cellulaire, qui ont continué à augmenter après 24 heures (**Figure 27**) montrant un schéma dose-dépendant, atteignant le plateau de saturation seulement à 72 heures (**Figure 28**). Parallèlement, l'extrait d'acétone obtenu par micro-ondes à 100 µg/mL d'extrait acétonique, pourrait déclencher une cytotoxicité à mesure que les niveaux de GST, GPx augmentaient davantage, mais étaient suivis d'une réduction des protéines thiols libres et de l'activité de la GR. Ce qui explique en définitive que les extraits acétoniques sont nettement plus efficace dans l'induction de l'action anti-inflammatoire, mais une exposition à de fortes doses peut altérer les cellules et causer de la toxicité. Ceci dit la toxicité observée, concerne uniquement notre modèle de cellules Jurkat, qui par ailleurs peut s'avérer sans toxicité pour les cellules normales, en se référant aux résultats des **Figures 8 et 9**.

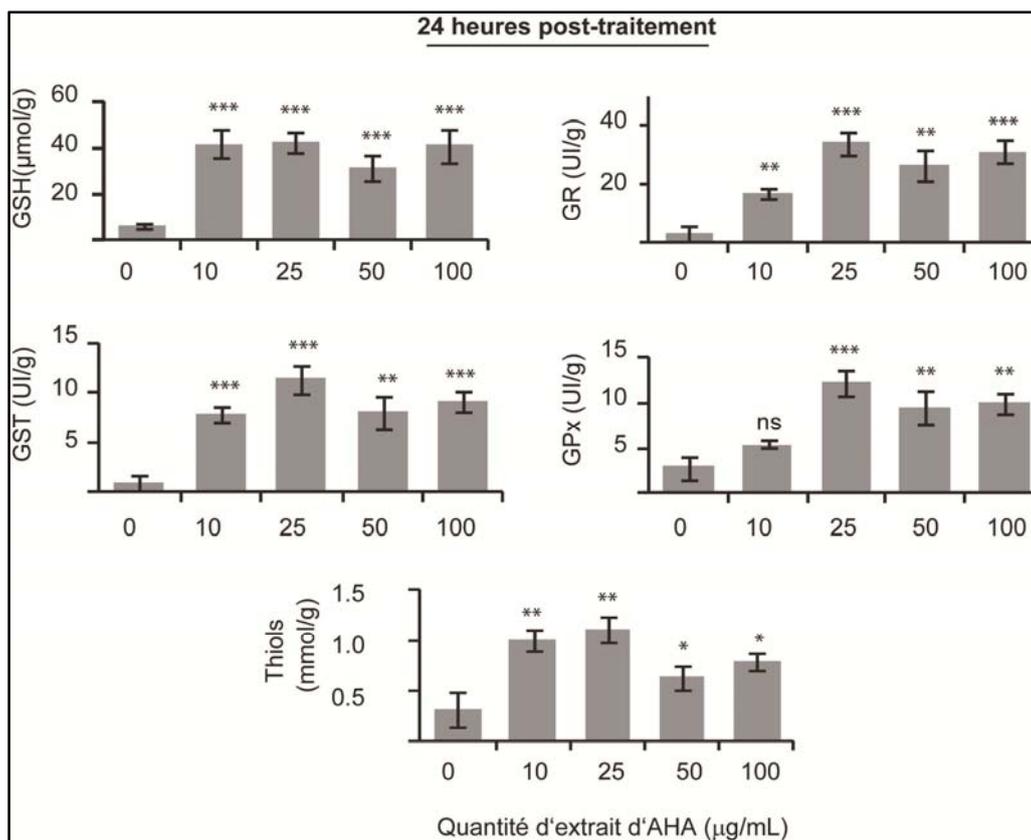


Figure 25 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits du méthanol micro-ondes ; à 24 heures de post-traitements.

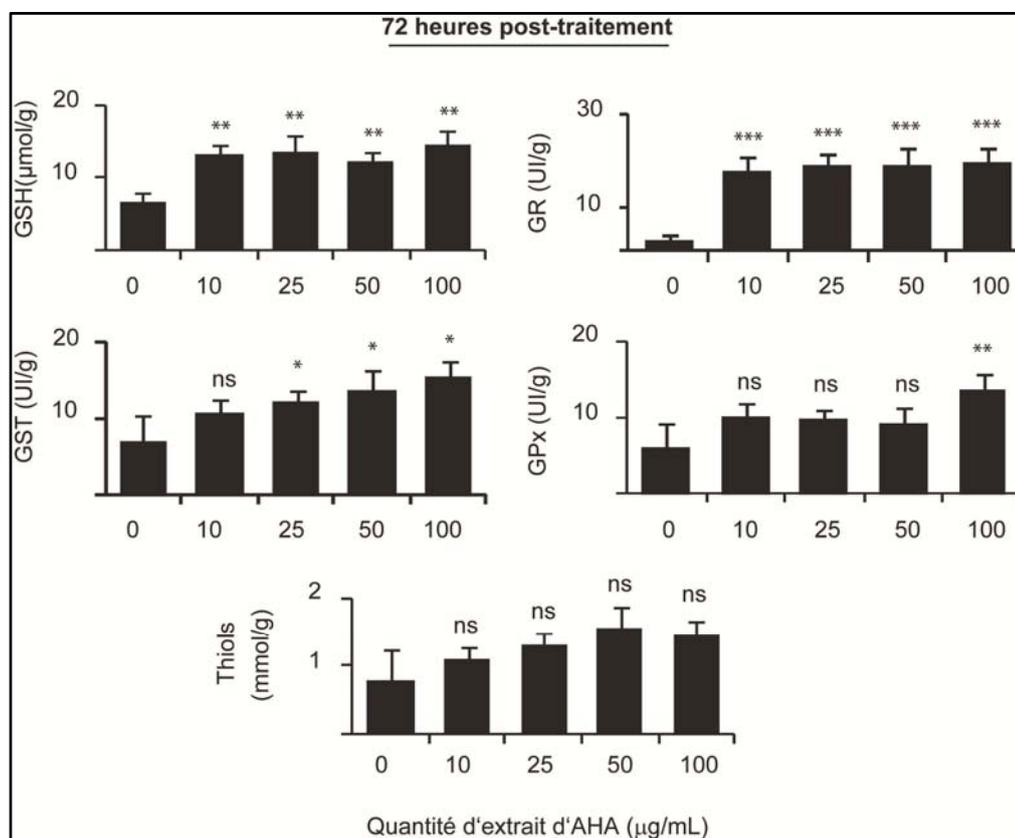


Figure 26 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits du méthanol micro-ondes ; à 72 heures de post-traitements.

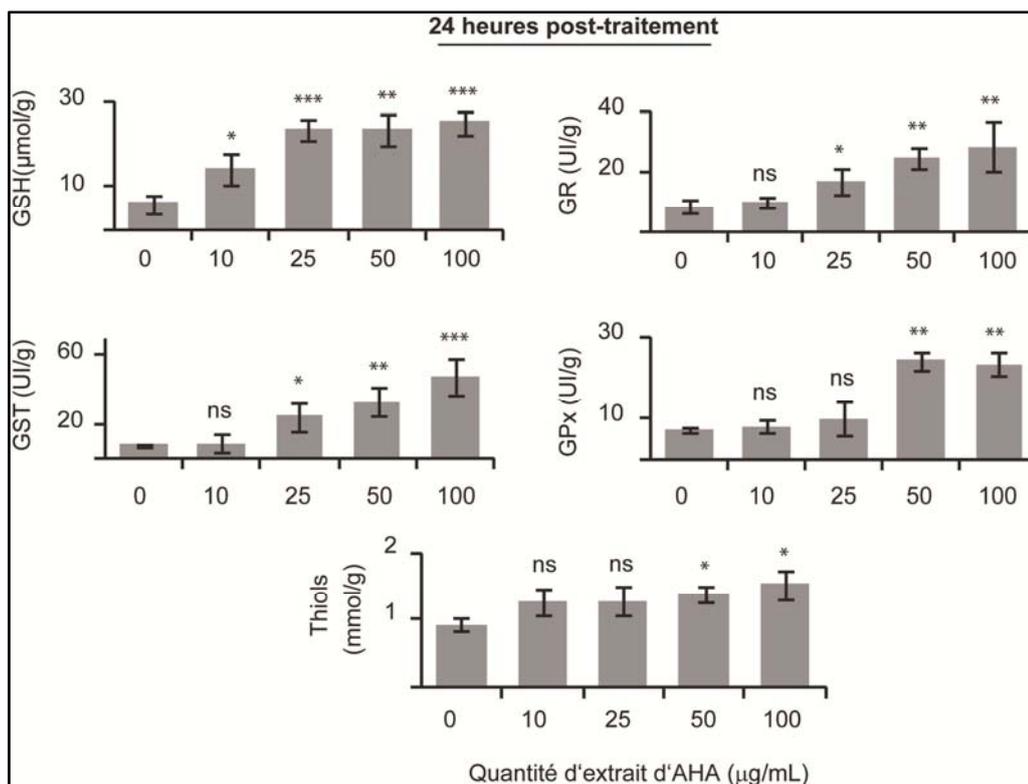


Figure 27 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'acétone micro-ondes ; à 24 heures de post-traitements.

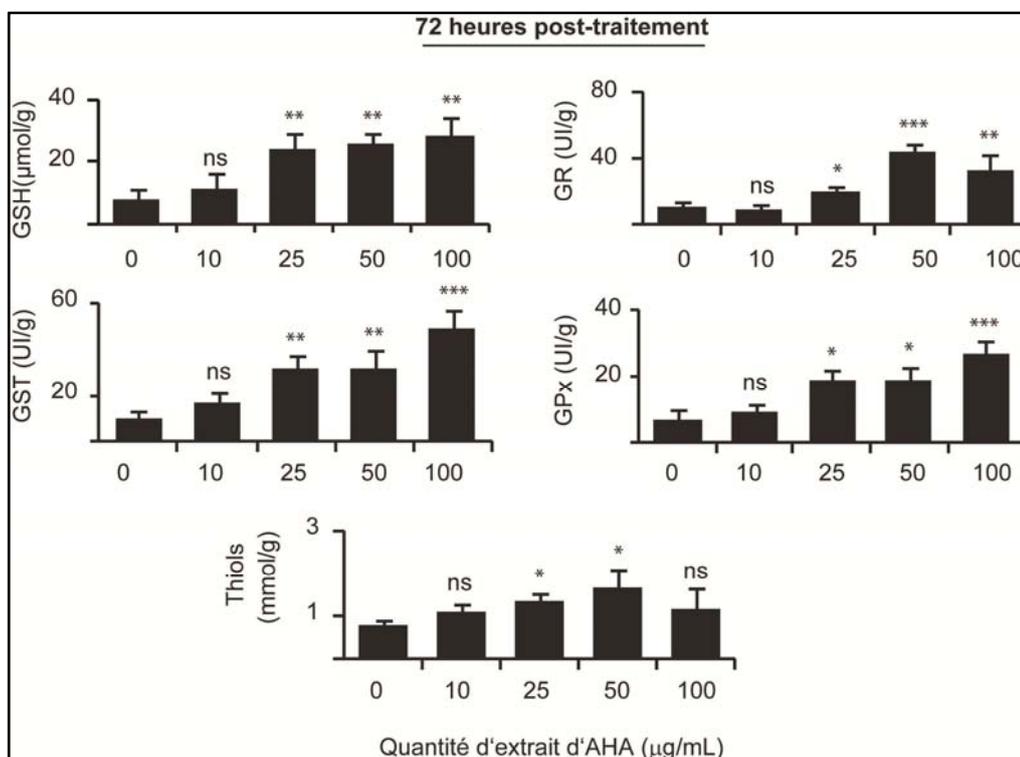


Figure 28 : Paramètres du statut redox des cellules Jurkat traitées avec des extraits d'acétone micro-ondes ; à 72 heures de post-traitements.

Plus précisément, à une dose élevée de 100 µg/mL dans les extraits acétoniques, l'augmentation permanente de la teneur en GSH n'était probablement pas suffisante pour rééquilibrer le statut redox des cellules, ce qui pourrait déclencher des dommages cellulaires alternatifs *via* la peroxydation lipidique et des dommages à l'ADN en raison de la récurrence d'un stress oxydatif permanent dans les cellules leucémiques Jurkat. Maintenant, nos analyses des capacités anti-oxydantes *in vitro* des extraits d'AHA à l'aide du dosage DPPH ont confirmé les résultats précédents (Bourgou et al., 2017; Khlifi et al., 2013), avec une puissance plus forte pour les extraits micro-ondes. Les cellules du sang total et la lignée Jurkat traités avec des extraits assistés par micro-ondes et par macération ont été induits, puis entièrement bloqués, dans une production d'ERO dépendante de la dose. Le principal effet de blocage des ERO est attribuable à la présence de plusieurs composés antioxydants tels que les flavonoïdes et les polyphénols (Younsi et al., 2018). Cependant, la stimulation du métabolisme du glutathion, qui renforce les capacités cellulaires contre les déclencheurs inflammatoires, domine. A long terme, dans la lignée cellulaire Jurkat, l'effet anti-inflammatoire, évalué par des paramètres du métabolisme du glutathion, a indiqué que les extraits assistés par micro-ondes ont un effet durable, maintenu sur 72 heures. L'explication réside peut-être dans les différences de contenu des extraits. Alternativement, certaines étapes métaboliques cellulaires peuvent générer d'autres composés bioactifs à partir de l'extrait, déclenchant en cascade la réponse cellulaire, indépendamment de l'induction des ERO, renforçant les effets bénéfiques sur la santé de l'AHA. Une explication possible est que les extraits d'AHA consommés peuvent avoir plusieurs effets bénéfiques en fonction du métabolisme ; l'étude du métabolisme des extraits d'AHA apportera plus de preuves dans ce sens. Cependant, il a été rapporté que l'extrait aqueux d'*Artemisia vestita*, un autre genre d'*Artemisia* pourrait améliorer les maladies inflammatoires (Yin et al., 2008). Une étude qu'a menée (Messoudene et al., 2011) stipule que les flavonoïdes extraits de l'AHA sont impliquées dans la réduction des effets inflammatoires.

L'une des premières études qui a été faite sur la caractérisation de l'effet anti-inflammatoire (Marrif et al., 1995) s'appuyant sur des tests cliniques affirme que les extraits d'*Artemisia herba-alba* ont un effet anti-inflammatoire et analgésique leurs résultats indiquent que l'extrait d'AHA possédait un effet analgésique important lorsqu'il est testé à 30 et 60 min après l'administration sur des souris. Cela appuie les conclusion des publications de (Conway, 1975; Morán et al., 1989), qui ont découvert qu'une espèce apparentée *Artemisia caerulescens* a un effet analgésique et anti-inflammatoire. Il n'est pas certain que l'*Artemisia* spp produit ces effets en inhibant la synthèse des prostaglandines ou par d'autres mécanismes. Les analyses de caractérisation des composés phénoliques sur nos extraits, ont montrées que les majeures

parties des composés majoritaires identifiés ont un effet anti-inflammatoire, en particulier le schaftoside qui est présent dans les extraits de l'AHA. Il est d'effet notable que le schaftoside, est un composé à effet anti-inflammatoire, ce qui en partie explique l'effet obtenu dans notre cas, mais pas uniquement.

L'analyse des capacités anti-oxydantes *in vitro* des extraits d'AHA à l'aide du test DPPH a confirmé les résultats précédents (Khlifi et al., 2013) et (Bourgou et al., 2017), avec un effet plus considérable pour les extraits micro-ondes. Cependant, *in vivo*, nous avons remarqué que seules les cellules traitées par les extraits d'AHA obtenus par la méthode d'extraction par solvant assisté aux micro-ondes montraient une réponse anti-oxydante dose-dépendante pour les deux solvants étudiés à chaque instant. Cela indique la présence de différentes molécules dans les extraits d'AHA qui modulent différemment le statut redox. Il est fascinant d'observer qu'une longue réponse anti-oxydante cellulaire chez les cellules leucémiques Jurkat est maintenue pendant 72 heures, comme il a été montré précédemment que la réponse dure moins de 24 heures après l'induction (Arab et al., 2006a, 2006b). L'explication pourrait résider dans la nature des extraits qui peut avoir différents composés, qui pourraient agir séquentiellement sur la cellule pour induire le glutathion. En variante, certaines étapes métaboliques cellulaires peuvent générer d'autres composés bioactifs à partir de l'extrait, déclenchant en cascade la réponse cellulaire anti-oxydante, indépendamment de l'induction des ERO, renforçant les effets bénéfiques de l'usage de l'AHA.

Conclusion générale :

La plante *Artemisia herba-alba* est largement utilisée sous différentes formes pour traiter plusieurs syndromes pathologiques chez l'homme, sur la base d'expériences empiriques et de connaissances locales transmises. Ici, notre travail a fourni plus de preuves sur la façon dont l'action préventive de l'AHA, contre les troubles chroniques ou inflammatoires, se produit d'une manière mécanistique. Nous pouvons conclure, donc, que nos extraits de plantes d'*Artemisia herba-alba* ne sont pas toxiques sur les cellules du sang total mais en revanche rendent les cellules malignes de type Jurkat plus vulnérables à forte dose, ce qui nous mène à confirmer leur effet anticancéreux (Khlifi et al., 2013; Lupidi et al., 2011; Tilaoui et al., 2015), ce qui ouvre un volet d'investigation dans la lutte contre la maladie de la leucémie. La réponse cellulaire immédiate aux extraits d'AHA est spectaculaire, car au bout d'une heure d'incubation, la quantité cellulaire du GSH au minimum triple, indépendamment des techniques d'extractions ou du solvant utilisé. Ce qui accompagne l'augmentation du GSH qui passe par une mobilisation de tout son métabolisme afin de palier à un stress éventuel. Cette réponse adaptée se passe dans des temps très courts, observée à une heure. Une régulation génique à ce stade très précoce est exclue.

Le renforcement du métabolisme du glutathion par les extraits d'AHA conditionne plutôt les cellules à réagir plus rapidement et plus puissamment contre les ERO et les circuits inflammatoires, suite à des infections sévères ou à l'exposition à des toxines environnementales (Pereira et al., 2013). Les résultats que nous avons obtenus montrent clairement que les extraits méthanolique et acétoniques de la plante *Artemisia herba-alba*, obtenus par les techniques d'extraction par micro-ondes ou macération, exercent un effet anti-inflammatoire et antioxydant.

De futures investigations sont nécessaires pour disséquer l'ensemble des mécanismes moléculaires, et les empreintes digitales de tous les extraits d'AHA pour évaluer les molécules bioactives individuellement, par lesquels le métabolisme du GSH reste stimulé plus longtemps dans les cellules, et si le métabolisme humain contribue à l'émergence de nouvelles entités non encore identifiées. Des moyens supplémentaires seront nécessaires pour bien mener le travail d'investigation du métabolisme des différents extraits d'AHA, impliquant des analyses en LC-MS/MS et des modèles *in vivo*.

En définitive, notre travail renforce les preuves des propriétés bénéfiques de la consommation d'AHA dans la population méditerranéenne et fournit des preuves pour une utilisation plus spécifique des extraits d'AHA.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abid, Z.B., Feki, M., Hédhili, A., Hamdaoui, M.H., 2007. *Artemisia herba-alba* Asso (Asteraceae) has equivalent effects to green and black tea decoctions on antioxidant processes and some metabolic parameters in rats. *Ann Nutr Metab* 51, 216–222. <https://doi.org/10.1159/000104140>
- Abu-Darwish, M.S., Cabral, C., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Efferth, T., Salgueiro, L., 2015. *Artemisia herba-alba* essential oil from Buseirah (South Jordan): Chemical characterization and assessment of safe antifungal and anti-inflammatory doses. *J Ethnopharmacol* 174, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.005>
- al-Khazraji, S.M., al-Shamaony, L.A., Twaij, H.A., 1993. Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba alba*. I. Effect of different parts and influence of the solvent on hypoglycaemic activity. *J Ethnopharmacol* 40, 163–166. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(93\)90064-c](https://doi.org/10.1016/0378-8741(93)90064-c)
- al-Shamaony, L., al-Khazraji, S.M., Twaij, H.A., 1994. Hypoglycaemic effect of *Artemisia herba alba*. II. Effect of a valuable extract on some blood parameters in diabetic animals. *J Ethnopharmacol* 43, 167–171. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)90038-8)
- ALmohaimeed, H.M., Mohammedsaleh, Z.M., Batawi, A.H., Balgoon, M.J., Ramadan, O.I., Baz, H.A., Al Jaouni, S., Ayuob, N.N., 2021. Synergistic Anti-inflammatory and Neuroprotective Effects of *Cinnamomum cassia* and *Zingiber officinale* Alleviate Diabetes-Induced Hippocampal Changes in Male Albino Rats: Structural and Molecular Evidence. *Front Cell Dev Biol* 9, 727049. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.727049>
- Alzweiri, M., Sarhan, A.A., Mansi, K., Hudaib, M., Aburjai, T., 2011. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Jordan, the Northern Badia region. *J Ethnopharmacol* 137, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.02.007>
- Amri, I., De Martino, L., Marandino, A., Lamia, H., Mohsen, H., Scandolera, E., De Feo, V., Mancini, E., 2013. Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Artemisia herba-alba* growing wild in Tunisia. *Nat Prod Commun* 8, 407–410.

- Arab, K., Rossary, A., Flourié, F., Tourneur, Y., Steghens, J.-P., 2006a. Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating γ -glutamyl-cysteinyl ligase and glutathione reductase. *Br J Nutr* 95, 18–26. <https://doi.org/10.1079/BJN20051626>
- Arab, K., Rossary, A., Soulère, L., Steghens, J.-P., 2006b. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *Br J Nutr* 96, 811–819. <https://doi.org/10.1017/BJN20061910>
- Aziz, M., Karim, A., El Ouariachi, E.M., Bouyanzer, A., Amrani, S., Mekhfi, H., Ziyat, A., Melhaoui, A., Bnouham, M., Legssyer, A., 2012. Relaxant Effect of Essential Oil of *Artemisia herba-alba* Asso. on Rodent Jejunum Contractions. *Sci Pharm* 80, 457–467. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1106-13>
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Idaomar, M., 2005. Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 585, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.03.013>
- Belhattab, R., Amor, L., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Figueiredo, A.C., 2014. Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature survey. *Arabian Journal of Chemistry* 7, 243–251.
- Bennett, R.N., Wallsgrove, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol* 127, 617–633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Boissier, P.E ; J.C. Heyland, 1839. *Voyage botanique dans le midi d’Espagne*. *Voy. Bot. Espagne*.
- Boudalia, M., Fernández-Domene, R.M., Tabyaoui, M., Bellaouchou, A., Guenbour, A., García-Antón, J., 2019. Green approach to corrosion inhibition of stainless steel in phosphoric acid of *Artemisia herba alba* medium using plant extract. *Journal of Materials Research and Technology* 8, 5763–5773. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.09.045>
- Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G., 2013. Herbalists and wild medicinal plants in M’Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *Journal of ethnopharmacology* 148, 395–402.
- Bouharmont, J., Évrard, C.-M., 2002. *Botanique systématique: une perspective phylogénétique*. De Boeck université, Paris Bruxelles.
- Bourgou, S., Bettaieb Rebey, I., Mkadmini, K., Isoda, H., Ksouri, R., Ksouri, W.M., 2017. LC-ESI-TOF-MS and GC-MS profiling of *Artemisia herba-alba* and evaluation of its bioactive properties. *Food Research International* 99, 702–712. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.009>

- Brigelius-Flohé, R., 2006. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem* 387, 1329–1335. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.166>
- Buhrmann, C., Kunnumakkara, A.B., Kumar, A., Samec, M., Kubatka, P., Aggarwal, B.B., Shakibaei, M., 2021. Multitargeting Effects of Calebin A on Malignancy of CRC Cells in Multicellular Tumor Microenvironment. *Front Oncol* 11, 650603. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.650603>
- Calatayud, P.-A., Marion-Poll, F., Sauvion, N., Thiéry, D. (Eds.), 2013. Interactions insectes-plantes. IRD Éditions. <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.22185>
- Carr, A., Frei, B., 1999. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13, 1007–1024. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.9.1007>
- Cereser, C., Guichard, J., Drai, J., Bannier, E., Garcia, I., Boget, S., Parvaz, P., Revol, A., 2001. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 752, 123–132. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00534-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00534-X)
- Chen, F., Zhang, H., Zhao, N., Yang, X., Du, E., Huang, S., Guo, W., Zhang, W., Wei, J., 2021. Effect of chlorogenic acid on intestinal inflammation, antioxidant status, and microbial community of young hens challenged with acute heat stress. *Anim Sci J* 92, e13619. <https://doi.org/10.1111/asj.13619>
- Cheraif, K., Bakchiche, B., Gherib, A., Bardaweel, S.K., Çol Ayvaz, M., Flamini, G., Ascrizzi, R., Ghareeb, M.A., 2020. Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Tyrosinase, Anti-Cholinesterase and Cytotoxic Activities of Essential Oils of Six Algerian Plants. *Molecules* 25, E1710. <https://doi.org/10.3390/molecules25071710>
- Cholet, J., Decombat, C., Vareille-Delarbre, M., Gainche, M., Berry, A., Senejoux, F., Ripoché, I., Delort, L., Vermerie, M., Fraisse, D., 2019. In vitro anti-inflammatory and immunomodulatory activities of an extract from the roots of *Bupleurum rotundifolium*. *Medicines* 6, 101.
- Conway, C.M., 1975. Editorial: “Old lamps for new.” *Br J Anaesth* 47, 811–812.
- Craig, W.J., 1999. Health-promoting properties of common herbs. *Am J Clin Nutr* 70, 491S-499S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.3.491s>
- da Silva Prade, J., Bálsamo, E.C., Machado, F.R., Poetini, M.R., Bortolotto, V.C., Araújo, S.M., Londero, L., Boeira, S.P., Sehn, C.P., de Gomes, M.G., Prigol, M., Cattelan Souza, L., 2020. Anti-inflammatory effect of *Arnica montana* in a UVB radiation-induced skin-burn model in mice. *Cutan Ocul Toxicol* 39, 126–133. <https://doi.org/10.1080/15569527.2020.1743998>

- D'Addabbo, T., Avato, P., 2021. Chemical Composition and Nematicidal Properties of Sixteen Essential Oils-A Review. *Plants (Basel)* 10, 1368. <https://doi.org/10.3390/plants10071368>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 52, 601–623. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408>
- de Mel, A., Murad, F., Seifalian, A.M., 2011. Nitric oxide: a guardian for vascular grafts? *Chem Rev* 111, 5742–5767. <https://doi.org/10.1021/cr200008n>
- De Natale, A., Pollio, A., 2012. A forgotten collection: the Libyan ethnobotanical exhibits (1912–14) by A. Trotter at the Museum O. Comes at the University Federico II in Naples, Italy. *J Ethnobiol Ethnomed* 8, 4. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-8-4>
- de Oliveira, C.B., Comunello, L.N., Lunardelli, A., Amaral, R.H., Pires, M.G.S., da Silva, G.L., Manfredini, V., Vargas, C.R., Gnoatto, S.C.B., de Oliveira, J.R., Gosmann, G., 2012. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. *Molecules* 17, 1113–1123. <https://doi.org/10.3390/molecules17011113>
- Dhalla, N.S., Temsah, R.M., Netticadan, T., 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18, 655–673. <https://doi.org/10.1097/00004872-200018060-00002>
- Dickinson, D.A., Forman, H.J., 2002. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* 973, 488–504. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04690.x>
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food chemistry* 97, 654–660.
- Dziubla, T., Butterfield, D.A., 2016. *Oxidative Stress and Biomaterials*. Academic Press.
- Eiserich, J.P., Patel, R.P., O'Donnell, V.B., 1998. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. *Mol Aspects Med* 19, 221–357. [https://doi.org/10.1016/s0098-2997\(99\)00002-3](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(99)00002-3)
- Farah, A., Duarte, G., 2015. Chapter 87 - Bioavailability and Metabolism of Chlorogenic Acids from Coffee, in: Preedy, V.R. (Ed.), *Coffee in Health and Disease Prevention*. Academic Press, San Diego, pp. 789–801. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00087-5>
- Ferrante, C., Recinella, L., Locatelli, M., Guglielmi, P., Secci, D., Leporini, L., Chiavaroli, A., Leone, S., Martinotti, S., Brunetti, L., Vacca, M., Menghini, L., Orlando, G., 2017. Protective Effects Induced by Microwave-Assisted Aqueous *Harpagophytum* Extract on Rat Cortex Synaptosomes Challenged with Amyloid β -Peptide. *Phytother Res* 31, 1257–1264. <https://doi.org/10.1002/ptr.5850>

- Feuerstein, I., Müller, D., Hubert, K., Danin, A., Segal, R., 1986. The constitution of essential oils from *Artemisia herba alba* populations of Israel and Sinai. *Phytochemistry* 25, 2343–2347. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81692-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81692-1)
- Folin, O., Ciocalteu, V., 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological chemistry* 73, 627–650.
- Folin, O., Denis, W., 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry* 12, 239–243.
- Gainche, M., Ripoché, I., Senejoux, F., Cholet, J., Ogeron, C., Decombat, C., Danton, O., Delort, L., Varelle-Delarbre, M., Berry, A., 2020. Anti-Inflammatory and cytotoxic potential of new phenanthrenoids from *Luzula sylvatica*. *Molecules* 25, 2372.
- Gao, X.-H., Zhang, S.-D., Wang, L.-T., Yu, L., Zhao, X.-L., Ni, H.-Y., Wang, Y.-Q., Wang, J.-D., Shan, C.-H., Fu, Y.-J., 2020. Anti-Inflammatory Effects of Neochlorogenic Acid Extract from Mulberry Leaf (*Morus alba* L.) Against LPS-Stimulated Inflammatory Response through Mediating the AMPK/Nrf2 Signaling Pathway in A549 Cells. *Molecules* 25, E1385. <https://doi.org/10.3390/molecules25061385>
- Gulati, P., Klöhn, P.C., Krug, H., Göttlicher, M., Markova, B., Böhmer, F.D., Herrlich, P., 2001. Redox regulation in mammalian signal transduction. *IUBMB Life* 52, 25–28. <https://doi.org/10.1080/15216540252774720>
- Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2831–2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>
- Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol Cell Biol* 22, 3565–3576. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.11.3565-3576.2002>
- Himmelfarb, J., McMonagle, E., McMenamin, E., 2000. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney International* 58, 2571–2578. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00443.x>
- Houée Levin C, Sicard Roselli C and Bergès J, 2005. *Chimie et Biochimie radicalaires*, Belin. ed. France.
- Imelouane, B., El Bachiri, A., Ankit, M., Khedid, K., Wathélet, J.-P., Amhamdi, H., 2010. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Morocco. *Banat's Journal of Biotechnology* 1.

- Jang, H.-S., Kook, S.-H., Son, Y.-O., Kim, J.-G., Jeon, Y.-M., Jang, Y.-S., Choi, K.-C., Kim, J., Han, S.-K., Lee, K.-Y., Park, B.-K., Cho, N.-P., Lee, J.-C., 2005. Flavonoids purified from *Rhus verniciflua* Stokes actively inhibit cell growth and induce apoptosis in human osteosarcoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1726, 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.08.010>
- J.C. Heyland, 1839. *Artemisia herba-alba* Asso Compositae P.E. Boissier, Voy. Bot. Espagne.
- Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3, S26-36; discussion S36-38. <https://doi.org/10.1002/ana.10483>
- Kang, H., Ku, S.-K., Jung, B., Bae, J.-S., 2015. Anti-inflammatory effects of vicenin-2 and scolymoside in vitro and in vivo. *Inflamm Res* 64, 1005–1021. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0886-x>
- Kappen, L., Lange, O.L., Schulze, E.-D., Evenari, M., Buschbom, U., 1972. Extreme water stress and photosynthetic activity of the desert plant *Artemisia herba-alba* asso. *Oecologia* 10, 177–182. <https://doi.org/10.1007/BF00347989>
- Khafagy, S.M., Gharbo, S.A., Sarg, T.M., 1971. Phytochemical investigation of *Artemisia herba alba*. *Planta Med* 20, 90–96. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1099670>
- Khlifi, D., Sghaier, R.M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., Bouajila, J., 2013. Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food Chem Toxicol* 55, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.004>
- Kim, M., Choi, S.-Y., Lee, P., Hur, J., 2015. Neochlorogenic Acid Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Activation and Pro-inflammatory Responses in BV2 Microglial Cells. *Neurochem Res* 40, 1792–1798. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1659-1>
- Kline, K., Lawson, K.A., Yu, W., Sanders, B.G., 2007. Vitamin E and cancer. *Vitam Horm* 76, 435–461. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(07\)76017-X](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(07)76017-X)
- Kline, K., Lawson, K.A., Yu, W., Sanders, B.G., 2003. Vitamin E and breast cancer prevention: current status and future potential. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8, 91–102. <https://doi.org/10.1023/a:1025787422466>
- Lee, I.-C., Bae, J.-S., 2016. Anti-inflammatory effects of vicenin-2 and scolymoside on polyphosphate-mediated vascular inflammatory responses. *Inflamm Res* 65, 203–212. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0906-x>
- Lu, S.C., 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* 13, 1169–1183.

- Lupidi, G., Bramucci, M., Quassinti, L., Fornari, E., Avenali, L., Khalife, H., Gali-Muhtasib, H.U., 2011. Antiproliferative activities of *Artemisia herba-alba* ethanolic extract in human colon cancer cell line (HCT116). *Altern Med Studies* 1, 14. <https://doi.org/10.4081/ams.2011.e14>
- Maret, W., 2003. Cellular zinc and redox states converge in the metallothionein/thionein pair. *J Nutr* 133, 1460S–2S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.5.1460S>
- Marrif, H.I., Ali, B.H., Hassan, K.M., 1995. Some pharmacological studies on *Artemisia herba-alba* (Asso.) in rabbits and mice. *J Ethnopharmacol* 49, 51–55. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01302-4](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01302-4)
- Meda, N.R., Fraisse, D., Gnoula, C., Vivier, M., Felgines, C., Senejoux, F., 2017. Characterization of antioxidants from *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. leaves using HPLC-DAD coupled with pre-column DPPH assay. *Eur Food Res Technol* 243, 1659–1666. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2873-7>
- Messaoudene, D., Belguendouz, H., Ahmedi, M.L., Benabdekader, T., Otmani, F., Terahi, M., Youinou, P., Touil-Boukoffa, C., 2011. Ex vivo effects of flavonoïds extracted from *Artemisia herba alba* on cytokines and nitric oxide production in Algerian patients with Adamantiades-Behçet's disease. *J Inflamm (Lond)* 8, 35. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-8-35>
- Mohamed, A.E.-H.H., El-Sayed, M., Hegazy, M.E., Helaly, S.E., Esmail, A.M., Mohamed, N.S., 2010. Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba-alba*. *Records of Natural Products* 4.
- Mohsen, H., Ali, F., 2009. Essential oil composition of *Artemisia herba-alba* from southern Tunisia. *Molecules* 14, 1585–1594. <https://doi.org/10.3390/molecules14041585>
- Moon, J.-K., Shibamoto, T., 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.* 57, 1655–1666. <https://doi.org/10.1021/jf803537k>
- Morán, A., Martín, M.L., Montero, M.J., Ortiz de Urbina, A.V., Sevilla, M.A., San Román, L., 1989. Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of the essential oil of *Artemisia caerulescens* subsp. *gallica*. *J Ethnopharmacol* 27, 307–317. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(89\)90005-6](https://doi.org/10.1016/0378-8741(89)90005-6)
- Moran, L.K., Gutteridge, J.M., Quinlan, G.J., 2001. Thiols in cellular redox signalling and control. *Curr Med Chem* 8, 763–772. <https://doi.org/10.2174/0929867013372904>
- Paiva, F.A., Bonomo, L. de F., Boasquivis, P.F., de Paula, I.T.B.R., Guerra, J.F. da C., Leal, W.M., Silva, M.E., Pedrosa, M.L., Oliveira, R. de P., 2015. Carqueja (*Baccharis trimera*) Protects against Oxidative Stress and β -Amyloid-Induced Toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 740162. <https://doi.org/10.1155/2015/740162>

- Pasquier, C., 1995. Stress oxydatif et inflammation. *Revue française des laboratoires* 1995, 87–92.
- Pereira, R.B., Sousa, C., Costa, A., Andrade, P.B., Valentão, P., 2013. Glutathione and the antioxidant potential of binary mixtures with flavonoids: synergisms and antagonisms. *Molecules* 18, 8858–8872. <https://doi.org/10.3390/molecules18088858>
- Petrovska, B.B., 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* 6, 1–5. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>
- Prasad, A.S., Beck, F.W.J., Snell, D.C., Kucuk, O., 2009. Zinc in Cancer Prevention. *Nutrition and Cancer* 61, 879–887. <https://doi.org/10.1080/01635580903285122>
- Quezel, P., Santa, S., 1962. *New flora of Algeria and meridional desertic regions (in French)*. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris.
- Radi, R., 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4003–4008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307446101>
- Rayman, M.P., 2005. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc* 64, 527–542. <https://doi.org/10.1079/pns2005467>
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 22, 375–383. <https://doi.org/10.3109/10715769509145649>
- Said, M.E.-A., Militello, M., Saia, S., Settanni, L., Aleo, A., Mammina, C., Bombarda, I., Vanloot, P., Roussel, C., Dupuy, N., 2016. *Artemisia arborescens* Essential Oil Composition, Enantiomeric Distribution, and Antimicrobial Activity from Different Wild Populations from the Mediterranean Area. *Chem Biodivers* 13, 1095–1102. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500510>
- Salah, S.M., Jäger, A.K., 2005. Two flavonoids from *Artemisia herba-alba* Asso with in vitro GABAA-benzodiazepine receptor activity. *J Ethnopharmacol* 99, 145–146. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.01.031>
- Saleh, M.A., Belal, M.H., el-Baroty, G., 2006. Fungicidal activity of *Artemisia herba alba* Asso (Asteraceae). *J Environ Sci Health B* 41, 237–244. <https://doi.org/10.1080/03601230500354774>
- Sarri, M., Mouyet, F.Z., Benziane, M., Cheriet, A., 2014. Traditional use of medicinal plants in a city at steppic character (M'sila, Algeria). *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 2, 31–35.
- Sartori, A., Bugatti, K., Portioli, E., Baiula, M., Casamassima, I., Bruno, A., Bianchini, F., Curti, C., Zanardi, F., Battistini, L., 2021. New 4-Aminoproline-Based Small Molecule

- Cyclopeptidomimetics as Potential Modulators of $\alpha_4\beta_1$ Integrin. *Molecules* 26, 6066. <https://doi.org/10.3390/molecules26196066>
- Sato, M., Bremner, I., 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 14, 325–337. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90029-t](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90029-t)
- Sayre, L.M., Smith, M.A., Perry, G., 2001. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 8, 721–738. <https://doi.org/10.2174/0929867013372922>
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30, 1191–1212. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00480-4)
- Schulze, E.-D., Hall, A.E., Lange, O.L., Evenari, M., Kappen, L., Buschbom, U., 1980. Long-term effects of drought on wild and cultivated plants in the Negev desert : I. Maximal Rates of Net Photosynthesis. *Oecologia* 45, 11–18. <https://doi.org/10.1007/BF00346700>
- Schulze, E.D., Lange, O.L., Kappen, L., Buschbom, U., Evenari, M., 1973. Stomatal responses to changes in temperature at increasing water stress. *Planta* 110, 29–42. <https://doi.org/10.1007/BF00386920>
- Segal, R., Feuerstein, I., Danin, A., 1987. Chemotypes of *Artemisia herba-alba* in Israel based on their sesquiterpene lactone and essential oil constitution. *Biochemical Systematics and Ecology* 15, 411–416. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(87\)90054-8](https://doi.org/10.1016/0305-1978(87)90054-8)
- Selenium and its relationship to cancer: an update - PubMed [WWW Document], n.d. URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14748935/> (accessed 10.20.21).
- Shampa Chatterjee, 2016. Oxidative Stress, Inflammation, and Disease - ScienceDirect [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128032695000024> (accessed 10.24.21).
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82, 291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I., 2005. VITAMIN E, OXIDATIVE STRESS, AND INFLAMMATION. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 151–174. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.24.012003.132446>
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology* 299, 152–178.
- Tahraoui, A., El-Hilaly, J., Israili, Z.H., Lyoussi, B., 2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco

- (Errachidia province). *J Ethnopharmacol* 110, 105–117.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.011>
- Tilaoui, M., Ait Mouse, H., Jaafari, A., Ziyad, A., 2015. Comparative Phytochemical Analysis of Essential Oils from Different Biological Parts of *Artemisia herba alba* and Their Cytotoxic Effect on Cancer Cells. *PLoS One* 10, e0131799.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131799>
- Townsend, D.M., Tew, K.D., 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7369–7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>
- Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S., 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* 10, 1677–1694. <https://doi.org/10.2174/1381612043384655>
- Wang, S., Li, X., Niu, Y., Liu, Y., Zhu, Y., Lu, X., Fan, X., Zhang, X., Wang, Y., 2016. Identification and screening of chemical constituents with hepatoprotective effects from three traditional Chinese medicines for treating jaundice. *J Sep Sci* 39, 3690–3699.
<https://doi.org/10.1002/jssc.201600437>
- Wang, X., Quinn, P.J., 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* 38, 309–336. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(99\)00008-9](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(99)00008-9)
- Wardman, P., Candeias, L.P., 1996. Fenton chemistry: an introduction. *Radiat Res* 145, 523–531.
- Wei, F., Tanokura, M., 2015. Chapter 17 - Organic Compounds in Green Coffee Beans, in: Preedy, V.R. (Ed.), *Coffee in Health and Disease Prevention*. Academic Press, San Diego, pp. 149–162. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00017-6>
- Whanger, P.D., 2004. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br J Nutr* 91, 11–28.
<https://doi.org/10.1079/bjn20031015>
- Yamahara, J., Kobayashi, G., Matsuda, H., Katayama, T., Fujimura, H., 1989. Vascular dilatory action of *Artemisia capillaris* bud extracts and their active constituent. *J Ethnopharmacol* 26, 129–136. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(89\)90060-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(89)90060-3)
- Yang, Q.C., Shi, W.Z., Li, R., Gan, J., 1982. The antimalarial and toxic effect of artesunate on animal models. *J Tradit Chin Med* 2, 99–103.
- Yashphe, J., Feuerstein, I., Barel, S., Segal, R., 1987. The antibacterial and antispasmodic activity of *Artemisia herba alba* Asso. II. Examination of essential oils from various chemotypes. *International journal of crude drug research* 25, 89–96.
- Yin, Y., Gong, F.-Y., Wu, X.-X., Sun, Y., Li, Y.-H., Chen, T., Xu, Q., 2008. Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *J Ethnopharmacol* 120, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.029>

- Yin, Y., Ye, L., Niu, Z., Fang, W., 2019. Anti-inflammatory effects of Vicenin-2 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Drug Dev Res* 80, 546–555. <https://doi.org/10.1002/ddr.21529>
- Younsi, F., Rahali, N., Mehdi, S., Boussaid, M., Messaoud, C., 2018. Relationship between chemotypic and genetic diversity of natural populations of *Artemisia herba-alba* Asso growing wild in Tunisia. *Phytochemistry* 148, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.01.014>
- Younsi, F., Trimech, R., Boulila, A., Ezzine, O., Dhahri, S., Boussaid, M., Messaoud, C., 2016. Essential Oil and Phenolic Compounds of *Artemisia herba-alba* (Asso.): Composition, Antioxidant, Antiacetylcholinesterase, and Antibacterial Activities. *International Journal of Food Properties* 19, 1425–1438. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1079789>
- Yu, W., Jia, L., Wang, P., Lawson, K.A., Simmons-Menchaca, M., Park, S.-K., Sun, L., Sanders, B.G., Kline, K., 2008. In vitro and in vivo evaluation of anticancer actions of natural and synthetic vitamin E forms. *Mol Nutr Food Res* 52, 447–456. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700254>

Annexes

Mode Opérateur pour l'obtention de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des taux de polyphénols totaux PTT :

• Préparation des réactifs :

1. Réalisation de la solution de Carbonate de Sodium à 150g/L

Dans un bécher de 100ml, peser, a la balance de précision **exactement** 150g de Carbonate de Sodium.

Dissoudre la poudre avec 500ml d'eau désionisée sous agitation magnétique.

Verser cette solution dans une fiole jaugée de 100ml, rincer le bécher avec de l'eau désionisée puis compléter jusqu'au trait de jauge avec de l'eau désionisée.

Stocker la solution dans un flacon de 1L, identifié, à température ambiante.

Préparation des étalons / gammes d'étalonnage :

1. Réalisation de la solution mère d'Acide Gallique (S1) à 50mg/100ml

Peser, à la balance de précision **exactement** 50mg de d'Acide Gallique dans un sabot de pesée.

Dans une fiole jaugée de 100ml, verser 50ml d'eau désionisée, introduire l'Acide Gallique préalablement pesée, rincer le sabot de pesée avec l'eau désionisée puis compléter jusqu'au trait de jauge avec l'eau désionisée.

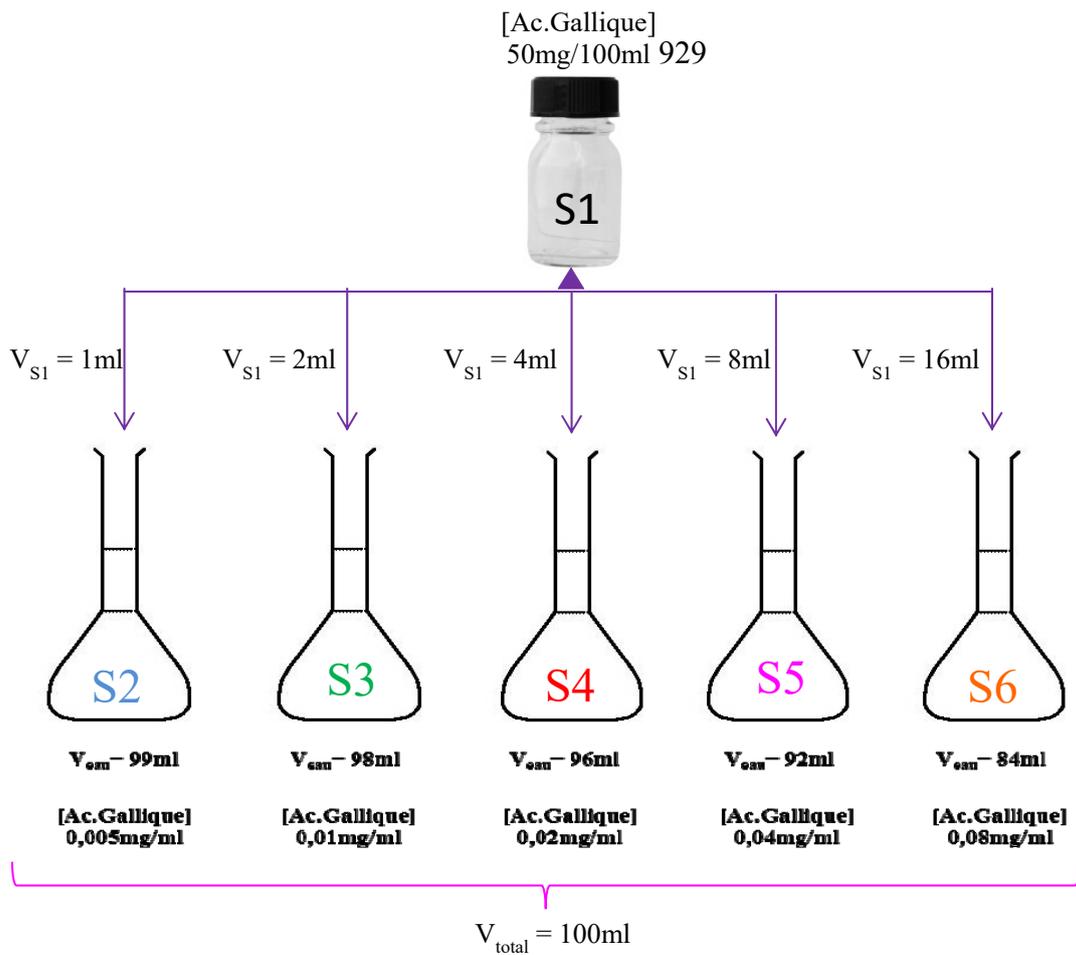
Stocker la solution dans un flacon de 100ml, identifié, à +4°C.

2. Préparation de la gamme étalon d'Acide Gallique de 0,08mg/ml à 0,005mg/ml)

Dans des fioles jaugées de 100ml, introduire :

- | | |
|---|----------------------------|
| ➤ S2: 1ml de S1 qsp 100ml d'eau désionisée | [Ac gallique] : 0,005mg/ml |
| ➤ S3: 2ml de S1 qsp 100ml d'eau désionisée | [Ac gallique] : 0,01 mg/ml |
| ➤ S4: 4ml de S1 qsp 100ml d'eau désionisée | [Ac gallique] : 0,02 mg/ml |
| ➤ S5: 8ml de S1 qsp 100ml d'eau désionisée | [Ac gallique] : 0,04 mg/ml |
| ➤ S6: 16ml de S1 qsp 100ml d'eau désionisée | [Ac gallique] : 0,08 mg/ml |

Réaliser ensuite les dilutions selon le schéma ci-après :



• **Mode opératoire :**

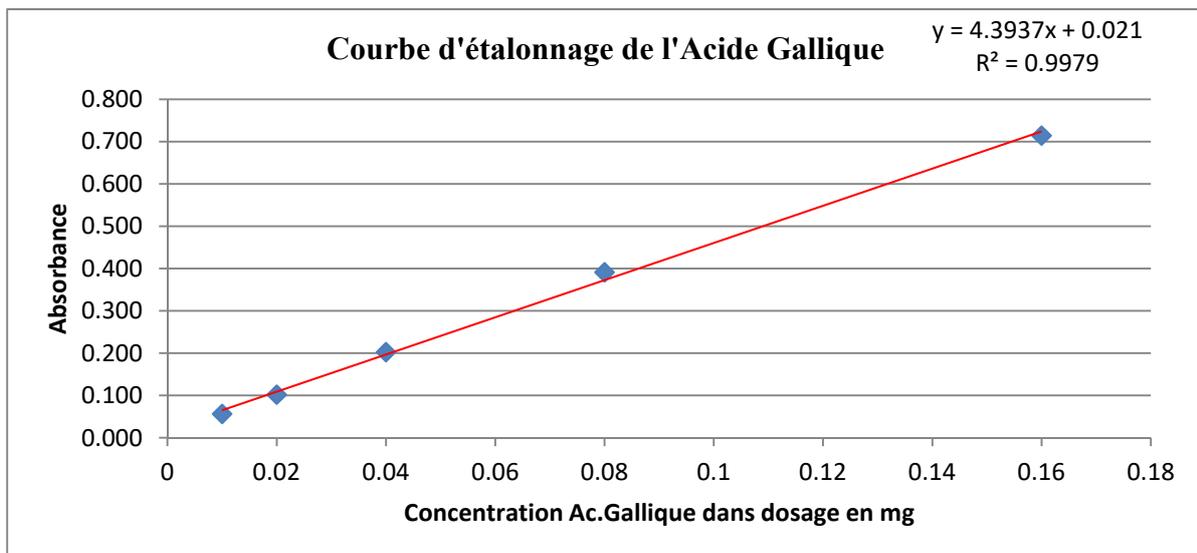
- Placer dans le spectrophotomètre une cuve en verre remplie d'eau désionisée
- Pour chaque concentration D'acide Gallique: Dans une fiole jaugée de 25ml introduire 2ml de solution d'acide Gallique + 1ml de réactif de Folin + 10ml d'eau désionisée et ajuster au trait de jauge avec le carbonate de sodium à 150g/L.
- Fermer les fioles, agiter par retournement et laisser développer la coloration durant 30min.
- Lire les absorbance à 740nm.

- **Exploitation des résultats :**

L'absorbance est mesurée à 740nm après 30 minutes de coloration. Elle est proportionnelle à la concentration en Acide Gallique.

Résultats de la courbe étalon de l'Acide Gallique ci-dessous :

[Ac gallique] (mg/mL)	0,5	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005
mg pour dosage	solut mère	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01
Essai 1	3,589	0,7061	0,3962	0,2027	0,0981	0,0593
Essai 2	3,629	0,7230	0,3800	0,2004	0,1034	0,0560
Essai 3	3,649	0,7145	0,3978	0,2048	0,1049	0,0545
Moyenne	3,622	0,715	0,391	0,203	0,102	0,057
Ecart type	0,031	0,008	0,010	0,002	0,004	0,002
CV%	0,848	1,183	2,516	1,086	3,498	4,339



Lors d'un dosage réalisé sur un extrait végétal, la teneur en polyphénols totaux sera déterminée à partir de l'équation de la droite d'étalonnage de l'Acide Gallique et sera exprimée en mg/g de poudre de plante.

Mode opératoire pour l'obtention de la courbe d'étalonnage pour le teste du DPPH

Conditions opératoires :

1.Solution de DPPH à 2,5mg/100mL

solution mère à 10mg/100mL de DPPH $M_{\text{pesée}}: 0,0100\text{g}$ soit 10mg

Dans une fiole jaugée de 100ml, dilué 10mg de DPPH dans du méthanol qsp le trait de jauge (Sm).

A partir de la solution mère, remplir a moitié une fiole de 100ml de méthanol, ajouter 25mL de cette solution puis compléter jusqu'au trait de jauge,

2.Solution de Trolox à 20mM

solution mère à 20mM de trolox $M_{\text{pesée}}:5,00\text{mg}$

Dans un flacon, peser 50mg de trolox et dilué dans 995 μl de méthanol

3.Conditions opératoires

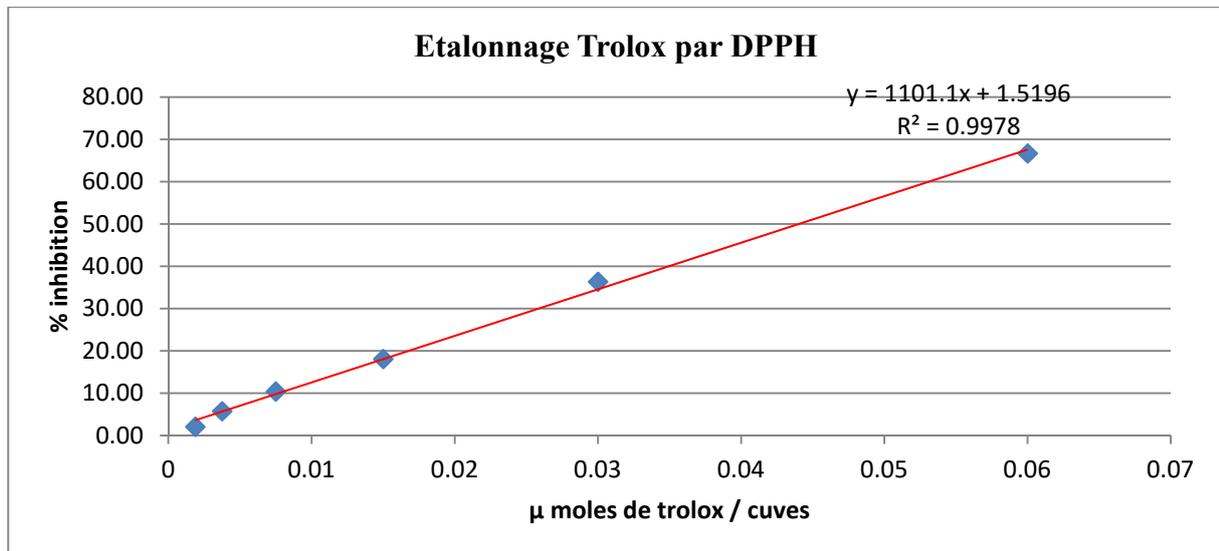
- solution mère de Trolox à 20mM
- solution de DPPH à 0,025mg/ml ds méthanol
- température ambiante (19-20°C)
- DO à t=30 min à 515 nm

4.Résultat et interprétations

[Trolox] (μM)	3000	1500	750	375	187,5	93,75
----------------------------	------	------	-----	-----	-------	-------

Essai 1	0,22	0,42	0,55	0,60	0,62	0,64
Essai 2	0,24	0,44	0,55	0,60	0,62	0,64
Essai 3	0,21	0,42	0,55	0,60	0,62	0,64
Moyenne	0,22	0,43	0,55	0,60	0,62	0,64
Témoin	0,67	0,67	0,67	0,67	0,66	0,65
% inhibition	66,67	36,32	18,06	10,38	5,72	2,04
Ecart-type	0,015	0,012	0,004	0,005	0,001	0,002
% CV	6,84	2,71	0,73	0,79	0,09	0,24

Figure : Courbe d'étalonnage au Trolox par DPPH





Anti-inflammatory and prolonged protective effects of *Artemisia herba-alba* extracts via glutathione metabolism reinforcement



Nadjet Bouchara^{a,b,*}, François Senejoux^b, Didier Fraisse^b, Catherine Felgines^b,
Florence Caldéfié-Chezet^b, Marie-Paule Vasson^{b,c}, Khodir Madani^{a,d}, Adrien Rossary^{b,*}

^a Laboratoire de Biomathématique, Biochimie, Biophysique et Scientométrie, Faculté des Sciences Exactes, Université de Bejaia, Bejaia 06000, Algeria

^b Université Clermont Auvergne, UNH (Human Nutrition Unity), Team ECREIN, UMR 1019 INRAE-UcA, Clermont-Ferrand F-63000, France

^c Unité de Nutrition, CHU, Centre Jean Perrin, CLARA, Clermont-Ferrand F-63000, France

^d Centre de Recherche en Technologie Agro-Alimentaire, Bejaia 06000, Algeria

ARTICLE INFO

Article History:

Received 31 January 2021

Revised 14 June 2021

Accepted 17 June 2021

Available online xxx

Edited by Dr L. Rarova

Keywords:

Artemisia herba-alba

Glutathione

Anti-inflammatory

Medicinal plants

Bioactive molecules

Chemoprevention

ABSTRACT

Artemisia herba-alba (AHA) is a medicinal plant known for its preventive capacities against chronic diseases. Inflammation is a naturally occurring cellular response to noxious stimuli, and both acute and chronic inflammation are involved in human disorders. Preventing and limiting the negative impact of inflammation by using phytochemicals has attracted a lot of attention. Here, we show that AHA extracts are potent anti-inflammatory products at low doses in white blood cells, treated with phorbol myristate acetate (PMA), a pro-inflammatory trigger. Regardless of the mode of extraction, i.e. maceration or microwave, all extracts reduced on dose-dependent manner reactive oxygen species (ROS) production induced by the pro-inflammatory compound PMA in white blood cells and leukemic Jurkat cell line. The induction of the anti-inflammatory effect was evaluated by the measurement of glutathione metabolism (glutathione reductase, transferase, and peroxidase), and protein-free thiols in Jurkat cells. Jurkat cells incubated with low to high concentrated AHA extracts, ranged from 10 to 100 g/mL, induced a fast cell response measured at one and six hours. Interestingly, extracts from the microwave showed a stronger induction, 5 to 10 fold changes at early time points, and maintained over 72 h. On the other hand, AHA extracts showed a moderate anti-proliferative effect in the leukemic Jurkat line. We concluded that AHA extracts enhance directly anti-inflammatory cell response, earlier via ROS induction. Later, however, vigorously maintained, independently from ROS, suggesting the intervention of the cellular metabolism in enhancing these effects. Considering the preventive and anti-inflammatory potential of AHA, regular consumption is advisable, and phytotherapeutic applications are encouraged to treat local inflammations.

© 2021 SAAB. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Medicinal plants are essential resources for traditional medicine in treating pathological disorders, bacterial and fungal infections. Regular consumption of some medicinal plants is associated with a low risk for developing chronic disease, suggesting prophylactic and protective effects against aging and organ failures (Petrowska, 2012). Most bioactive phytoconstituents mediate protective mechanisms by specific molecular pathways (Craig, 1999). However, the benefit of medicinal plants was determined empirically and little is known about their mechanisms of action.

* Corresponding authors at: Laboratoire de Biomathématique, Biochimie, Biophysique et Scientométrie, Faculté des Sciences Exactes, Université de Bejaia, Bejaia 06000, Algeria.

E-mail addresses: nbouchara@yahoo.fr (N. Bouchara), Adrien.rossary@uca.fr (A. Rossary).

The genus *Artemisia* L. englobes small herbs and shrubs that belong to the important family Asteraceae and occurs throughout the northern half of the world (Quezel and Santa, 1962). The genus *Artemisia* encompasses more than 500 species presenting a huge phytochemical variability (Amri et al., 2013). From a large number of *Artemisia* species, produced essential oils are used in the cosmetics and pharmaceutical industry, with a profitable economic value. *Artemisia herba-alba* is widely distributed in the Mediterranean area, growing in semi-arid regions. The plant *Artemisia herba-alba* is employed in different forms to treat diseases based on empirical experiences and transmitted local knowledge. The essential oil extracted by distillation from the dried leaves and the thin branches of the plant are extensively used in traditional medicine, treating bronchitis, and local skin infections. Infusions of *Artemisia herba-alba* treat cough, intestinal pain, diabetes, and inflammations (Khlifi et al., 2013). The chemical composition and the fingerprint of *Artemisia herba-alba* may vary. Enriched bioactive single compounds are

mainly volatile molecules. Among the dominant volatile constituents are the monoterpenes including two diastereomeric forms of thujone, 1–8 cineole and camphor (Younsi et al., 2018). Some reports investigated the composition of dominant compounds and analyzed a number of polyphenols, considered as the main antioxidants against reactive oxygen species (ROS) in organisms. These reports indicated a high enrichment for polyphenols as measured by different assays (Khlifi et al., 2013; Said Mel et al., 2016; Younsi et al., 2018). To characterize experimentally the biological properties of *Artemisia herba-alba* (AHA), reports focused on antibacterial and antifungal actions (Abu-Darwish et al., 2015; Saleh et al., 2006). Others demonstrated a reduction in pro-inflammatory cytokine productions (Messaoudene et al., 2011). However, it remains unclear whether the beneficial physiological properties of AHA extracts were associated only with the quantity and the number of polyphenols, and flavonoids present, which possess the scavenging potential that is seen *in vitro*, or/and with the functional modulation of molecular pathways, which safeguards cellular homeostasis in a more complex action.

Phenolics and flavonoids are ubiquitous in plants and possess antioxidant activities *in vitro*. They are obtained exclusively through the diet; their protective effect is direct and can neutralize regularly ROS by a high intake of rich foods of fruits and vegetables (Rice-Evans et al., 1995). Glutathione (GSH), however, is an intracellular antioxidant, responsible for cellular homeostasis (Ostergaard et al., 2004). GSH is synthesized by the rate enzyme gamma-glutamylcysteinyl ligase and is maintained in the reduced form by glutathione reductase through regeneration of oxidized glutathione (GSSG). Glutathione is a cofactor for multiples detoxifying enzymes such as glutathione transferase (GST) and glutathione peroxidases (GPx). Both enzymes transfer GSH moiety to block reactive chemical groups. Therefore, it is well established that glutathione is the major redox buffer in the cell. Many human diseases are associated with phases of acute or chronic inflammatory episodes, which can lead to irreversible organ damages. The severity of the syndrome is proportional to ROS level and cell death occurring in the tissues. Indeed, increased ROS occurs early in such syndromes, and likely preclinical usage of antioxidants reduced inflammation and tissue injury. Of note is that the direct antioxidant activity of some compounds is associated with conflicting results (Booth et al., 2011). Hence, external modulation of GSH level became one of the chemopreventive strategies to reduce inflammation-mediated damage (Pereira et al., 2013).

The objective of our work is the molecular characterization of the anti-inflammatory effects of AHA extracts through the maintenance of the redox balance against pro-inflammatory triggers. We hypothesized that endogenous upregulation of glutathione metabolism by AHA extracts blocks PMA mediated inflammation, which is more relevant from the physiological point of view. Especially in the case of regular consumptions aiming for chemopreventive or therapeutic usage of AHA. Our work describes the modulation of glutathione metabolism and ROS level by AHA extracts, and provides a piece of clear evidence for the chemopreventive role of AHA against inflammation by redox buffering.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Artemisia herba-alba samples were collected from the region of Bejaia (located in the east of Algeria) in August 2017. The taxonomic identity of the plant was confirmed by comparing voucher specimen with a known identity already deposited in the herbarium (N° 02888). The species was identified by Dr. Hadjadj-Aoul Seghir and stored as a voucher specimen in the plant Herbarium of the department of Biology, University of Oran 1 Ahmed Ben Bella, Algeria. The harvested fresh aerial parts including stems plus leaves with no flowers were rinsed with distilled water, then oven-dried for 72 h at 40 °

C, the powder was passed through standard 250 μm sieve and only fraction with particle size < 250 μm was used. The powder was stored in amber glass jars until use. The extraction was performed using solvents with different polarity: distilled water, methanol/water (80:20, v/v), ethanol/water (80:20, v/v), acetone/water (80:20, v/v) and a mixture of methanol, ethanol, acetone and water (25:25:25:25, v/v/v/v).

2.2. Microwave assisted extraction

A modified microwave oven was used to perform the extraction under constant sample volume. The modified microwave (NN-S674MF, Samsung, Malaysia) with cavity dimensions of 22.5 cm \times 37.5 cm \times 38.6 cm was equipped with a digital control system for irradiation at 2450 kHz working frequency and microwave power (the latter linearly adjustable from 200 to 1000 W). Six grams of powder were added to 120 mL of 80% (v/v) extraction solvent. The mixture was heated using 200 W power for 25 min. Extracts were concentrated by rotary evaporation under vacuum until solidification and stored at -80 °C. All stock solutions were prepared freshly before use at 10 mg/mL of each AHA extract in DMSO.

2.3. Conventional solvent extraction

For the conventional extraction, six grams of sample powder were placed in a volume of 120 mL of 80% (v/v) extraction solvent or a mixture of equal volumes of solvents. The mixture was subjected to magnetic stirring for 24 h at 10 °C in the darkroom. Extracts were concentrated by rotary evaporation under vacuum and stored at -80 °C. Except for total phenolic content measurements, all stock solutions were prepared freshly before use at 10 mg/mL of each AHA extract in DMSO.

2.4. Total phenolic contents (TPC)

Total phenolic contents were determined according to the Folin-Ciocalteu assay (Folin, 1929; Folin and Denis, 1912). The working solutions were obtained by the dilution of the stock solutions at 1:50 in DMSO. The final concentrations were 200 $\mu\text{g/mL}$.

In brief, 2 mL of working solutions from different *Artemisia herba-alba* extracts were mixed with 10 mL deionized water, 1 mL of Folin-Ciocalteu reagent (Carlo Erba Reagents, Val-de Reuil, France), and completed with 12 mL sodium carbonate of 1.5 M. After incubation at 25 °C for 30 min, the absorbance of the samples was measured at 740 nm using a UV-Visible spectrophotometer. A standard calibration curve of gallic acid was performed ($y = 4.394x + 0.021$; $R^2 = 0.9979$). All analyses were performed in triplicate, and TPC were expressed as milligram of gallic acid equivalents per gram of dried extract (mg GAE/g).

2.5. Determination of free radical scavenging activity

The antioxidant activity of *Artemisia herba-alba* extracts was measured by bleaching of the purple-colored solution of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) following a previously reported method (Meda et al., 2017). A solution of 2.5 $\mu\text{g/mL}$ of AHA extracts in DMSO was used as a working solution. Ten microliters of *Artemisia herba-alba* working extract solution was mixed with 2.5 mL of DPPH (25 $\mu\text{g/mL}$ in methanol) incubated for 30 min at 37 °C, and the absorbance at 515 nm was measured. The antioxidant capacity was expressed as a percentage of inhibition of DPPH radical (% DPPH inhibition) calculated according to the following equation: Percentage of DPPH inhibition (%) = $[(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$. $\text{Abs}_{\text{control}}$ is the absorbance of DPPH radical and methanol; $\text{Abs}_{\text{sample}}$ is the absorbance of DPPH radical and sample extract at 30 min. All analyses

were done in triplicate and radical scavenging activities were indicated as IC₅₀.

2.6. Isolation of whole white blood mononuclear cells (WBCs) and cell culture

Blood buffy coats were collected from healthy human volunteers ($n = 3$ volunteers, Établissement Français du Sang, EFS, Clermont-Ferrand, France). They were carefully layered on a double gradient of Ficoll–Histopaque1119[®] and 1077[®] as previously described (Cholet et al., 2019, Gainche et al., 2020). After centrifugation ($400 \times g$, 40 min at 20 °C), the first layer of plasma was aspirated, reaching the monocytes and lymphocytes phase (WBCs) just above the 1.077 g/mL layer. Then, the Ficoll layer was aspirated, yielding a phase of polymorphonuclear cells (PMNs) corresponding to a density between 1.119 and 1.077 g/mL. The WBCs were washed with RPMI and centrifuged (5 min, $400 \times g$) twice and then suspended in 5 mL of supplemented RPMI (FBS10%, gentamicin 50 $\mu\text{g/mL}$, and glutamine 2 mmol/L). Meanwhile, the residual erythrocytes in the WBCs phase were lysed by hemolytic shock using ammonium chloride solution. Then, the WBCs were washed with RPMI, centrifuged, and suspended in 1 mL of supplemented RPMI.

Human lymphoid T cell lines (Jurkat) were obtained from ATCC cell collection and maintained in RPMI-1640 medium (Biovest, Nuaille, France) supplemented with 10% fetal calf serum L-glutamine (2 mmol/L), penicillin 50 mL and streptomycin (50 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). The cells (Jurkat and WBCs) were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cell preparations were adjusted to 10⁶ cells/mL for all assays. All glutathione metabolism parameters were measured in Jurkat cell lysates following incubation of the cells with the different concentrations of each AHA extract. The collections of cell lysates were performed according to typical protocols for each assay (details were listed for each assay hereafter).

2.7. Quantification of reactive oxygen species (ROS) production

ROS production assay was carried out using dihydrorhodamine 123 (DHR) 10 mM (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) that can passively diffuse through cell membranes where it can be oxidized by ROS to rhodamine 123, and detected as green fluorescence. Human white blood cells (WBCs) and Jurkat human cell lines were plated at a density of 1.10⁶ cell/mL in a 96-well plate. Human white blood and Jurkat cells were treated with *Artemisia herba-alba* diluted extracts starting with 10 mg/mL of stock solution concentration. Dilutions were made so that the final concentrations in the wells are 100, 50, 25, and 10 $\mu\text{g/mL}$. One part of the cells was plated with PMA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) 1 μM and the others were left without PMA as control. ROS production was measured every 5 min during 2 h at 37 °C, using a microplate reader (Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer[®], ThermoScientific Waltham, MA) with an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm. Fluorescence was corrected for background for each well. All assays were in triplicates.

2.8. Enzymatic activities measurements

Total proteins amounts were measured using the bicinchoninic acid method (BCA from Pierce, Interchim, France), according to the manufacturer's instructions. Standard curve was obtained using a standard solution of bovine serum albumin (2 g/L).

Glutathione reductase (GR) activity was determined as previously reported (Arab, 2006b). The cell lysate was incubated with buffer reagent (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.16 mM NADPH, and 4.6 mM oxidized glutathione (GSSG), pH 7.4) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Kinetic NADPH oxidation was followed at

340 nm and 37 °C for 3 min in a microplate spectrophotometer reader. GR activity, normalized to the protein content, was in UI/g.

Glutathione peroxidase (GPx) activity resulted in the oxidation of GSH in the presence of tert-butyl-hydroperoxide. Secondly GR recycled GSSG in the presence of NADPH as previously described (Mahbouli et al., 2018). The cell lysate was incubated with buffer reagent (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 22 mM Tert-butyl-hydroperoxide, 5 mM GSH, 0.1 IU/mL GR, 2 mM NADPH, pH 7.4). (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). NADPH oxidation was measured using a microplate spectrophotometer reader set at 340 nm and 37 °C. GPx activity was normalized to the protein cell lysate content and expressed as UI/g of proteins.

Glutathione S-transferase (GST) activity was quantified following the method described in (Arab, 2006a). The cell lysates were incubated with buffer reagent (50 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, pH 7.4). (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). The kinetic 1-chloro-2,4-dinitrobenzene-glutathinylation was followed at 340 nm and at 37 °C in a microplate spectrophotometer reader. The GST activity was normalized to the protein content was in UI/g.

2.9. Total glutathione and total protein thiols

Total glutathione was determined by the method of (Cereser et al., 2001). In brief, dithiothreitol reduced (DTT) cell lysate for 10 min at room temperature and glutathione ethyl ester was added as an internal standard. After protein precipitation, the supernatant was derivatized by adding ortho-phthalate-aldehyde (OPA) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). The HPLC separation of GSH—OPA adducts used a UP3 HDO C-18 reversed-phase silica column (150 \times 3.60 mm, particle size 3 μm) from Phenomenex (Interchim, Montluçon, France), maintained at 37 °C followed by fluorimetric detection at 420 nm after excitation 340 nm (Summit HPLC system, Dionex SA, Courtaboeuf, France). Derivatives eluted using a 10–15% acetonitrile gradient in a 25 mM phosphate buffer at pH6 for 5 min. The flow rate was 0.25 mL/min for an elution run of 20 min. Chromatograms were integrated using Chromeleon software from Dionex (version 6.80, Dionex SA, Courtaboeuf, France). GSH content, calculated using a standard curve plotted under the same conditions and expressed in $\mu\text{mol/g}$ protein.

Protein thiols were assayed according to the method of (Himmelfarb et al., 2000). In brief, free thiol groups oxidized by dithiobis-2-nitrobenzoic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) were measured at 405 nm on a microplate spectrophotometer reader. The cell lysate-free thiol concentration was expressed as a ratio to protein content in mmol/g.

2.10. Cell viability measurements

Cell viability was estimated by the resazurin assay using 7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) as described in the manufacture protocol (Abcam, Paris, France). The oxidized, blue, non-fluorescent resazurin is reduced to resorufin a pink fluorescent dye by cellular activity, due to oxygen consumption through metabolism, which is therefore proportional to aerobic respiration.

In brief, human white blood mononuclear cells (PBMCs) or Human leukemic cancer cell lines (Jurkat) were plated at a density of 1.10⁶ cell/mL in a 96-well plate. WBCs and Jurkat cells were treated with *Artemisia herba-alba* diluted extracts starting with 10 mg/mL stock solution concentration. Dilutions were made so that the final concentrations in the wells are 100, 50, 25, and 10 $\mu\text{g/mL}$. A part of cells/extracts were plated with PMA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) 1 μM , and the others were left without PMA as control. Resazurin oxidation was measured every 5 min during 2 h at 37 °C, using a microplate reader (Fluoroskan Ascent Microplate

Fluorometer®, Thermoscientifique Waltham, MA) set on an excitation wavelength of 544 nm and an emission wavelength of 590 nm. Fluorescence was corrected for background for each well. All assays were carried out in triplicates.

2.11. Statistical analysis

Each experiment was performed in triplicate, the average values are treated as single data points, and the data are expressed as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). For all assays, the statistical comparisons were performed using ANOVA with one way, and the significances were indicated as *P*-values in comparison to the control as following: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, or non-significant (ns) if *P*-value > 0.05 . For multiples comparisons with continues data points, Mann-Whitney test was used, and the *p*-values was calculated following each serial data in comparison to the related control.

3. Results and discussion

To get more insight into how *Artemisia herba-alba* mediates protective effects against inflammation, and in preventing the initiation of chronic related disorders, we investigated *in vitro* and *in vivo*, the capacities of AHA extracts obtained from different extraction methods i.e. maceration or microwave. We tested AHA extracts in human white blood cells and leukemic derived cell line Jurkat treated with phorbol myristate acetate (PMA), a pro-inflammatory chemical compound. The enhancement of glutathione metabolism by AHA extracts will support the evidence of a chemopreventive role against inflammation through redox buffering.

3.1. Total phenolic contents and DPPH radical scavenging capacities of *Artemisia herba-alba* extracts

To optimize the effectiveness of the extractions, we carried out two extraction modes using different solvents. AHA dried samples were macerated or subjected to microwave-based extraction in different solvents (water, methanol, ethanol, acetone, or a mix of all solvents at equal volumes). Estimation of total phenolic contents (TPC) revealed that higher amounts were obtained using the microwave method, which yielded of about 20% more compared to the maceration method (Table 1). As expected, water in both extraction methods yielded lower TPC compared to organic solvents. In maceration mode, acetone extract contained the highest amount of TPC followed by methanol, and ethanol extracts. In microwave-assisted extraction, acetone, methanol and ethanol gave similar amounts of TPC. Of note, the combination of different solvents did not improve polyphenols extraction in both extraction modes (Table 1). To assess the relationship between TPC and *in vitro*, antioxidant capacities of AHA extracts we used DPPH free radical method to estimate radical scavenging capacities of AHA extracts. Similarly, with TPC evaluations, acetone, ethanol, and methanol extracts exhibited the highest antioxidant capacities in both modes of extraction, attested by their lower IC₅₀ values (Table 2). Again, no improvements in antioxidant capacities were observed for extracts with mixed solvents. Water extracts, which exhibited the weakest activities in both extraction methods (Tables 1 and 2). A good correlation was observed between TPC and radical scavenging effects of all extracts, determined by linear correlation ($R^2 = 0.804$), as similarly reported (Singleton., 1999). The radical scavenging properties observed *in vitro* are attributed to the phenolic constituents as suggested by the substantial correlation between TPC and DPPH scavenging activities of the extracts (Tables 1 and 2), concisely reported in by different studies (Abu-Darwish et al., 2015; Khelifi et al., 2013; Messaoudene et al., 2011). Polyphenols are potent reducing agents, acting as hydrogen donors and free radical

Table 1

Total phenolic content (TPC) of *Artemisia herba-alba* extracts obtained from microwave or maceration method. Data are an average of 3 replicates \pm standard deviation (SD), and the statistical difference is significant if *P*-value < 0.05 or non-significant if *P*-value > 0.05 (ns).

Extraction mode	Solvents	TPC (mg GAE/g dry weight)	<i>P</i> -value
Microwave	Water	114.58 \pm 0.022	–
	Methanol	167.47 \pm 0.005	0.001
	Ethanol	177.32 \pm 0.007	0.001
	Acetone	176.14 \pm 0.031	0.001
	Equal volume mixture	158.08 \pm 0.005	0.001
Maceration	Water	67.45 \pm 0.010	–
	Methanol	140.09 \pm 0.010	0.001
	Ethanol	139.31 \pm 0.010	0.001
	Acetone	150.42 \pm 0.43	0.001
	Equal volume mixture	131.53 \pm 0.005	0.001

Table 2

DPPH radical scavenging capacities of *Artemisia herba-alba* extracts obtained from microwave or maceration method. Data are an average of 3 replicates \pm standard deviation (SD), and the statistical difference is significant if *P*-value < 0.05 or non-significant if *P*-value > 0.05 (ns).

Extraction mode	Solvents	IC ₅₀ (μ g/ml)	<i>P</i> -value
Microwave	Water	38.14 \pm 3.71	–
	Methanol	19.25 \pm 2.62	0.002
	Ethanol	20.50 \pm 4.73	0.007
	Acetone	18.64 \pm 5.91	0.008
	Equal volume mixture	25.85 \pm 3.60	0.015
Maceration	Water	114.52 \pm 8.42	–
	Methanol	30.16 \pm 3.23	0.001
	Ethanol	32.95 \pm 5.9	0.001
	Acetone	23.12 \pm 3.29	0.001
	Equal volume mixture	26.82 \pm 4.21	0.001

scavengers. In our study, total phenolic contents in *Artemisia herba-alba* extracts were slightly higher compared to what was previously reported: TPC = 123.95 g GAE /kg dry weight (Khelifi et al., 2013), TPC = 87.5 mg GAE/g dry weight (Bourgou et al., 2017) and TPC = 13.06 \pm 0.40 mg GAE/g dry weight (Djeridane et al., 2006). The choice of the solvent and the method of extraction remains the determining point. These are not the only parameters that can affect the phenolic yield. Indeed, climate conditions (hot temperatures high solar exposure, dryness, short growing season) may be the reason for the increase in phenolic content (Djeridane et al., 2006). Based our findings, we decided to focus further evaluations on methanol and acetone extracts which exhibited the highest radical scavenging properties in both microwave-assisted and maceration methods.

3.2. Evaluation of cytotoxicity effects of *Artemisia herba-alba* extracts

After selecting the most effective AHA extracts *in vitro* obtained using methanol and acetone by maceration and microwaves-assisted extraction methods, we evaluated their cytotoxicity and their protective effects against PMA treated human white blood cells (WBCs: monocytes and lymphocytes, and polymorphonuclear cells) and Jurkat cell line. We exposed cells to different concentrations (the same we used *in vitro* assays) of AHA extracts, alone or in the presence of PMA for up to 2 h post-treatment. Immediate treatments using AHA extracts and PMA or AHA extracts alone obtained from both extraction modes, did not affect the cell viability of human blood cells. However, we observed a moderate synergistic effect in reduction of cellular viability of about 20%, while incubating Jurkat cells with AHA extracts and PMA, suggesting toxic cooperative effects happening early (Fig. 1). In this cell cellular model, we appreciated the absence of cytotoxicity in WBCs (Fig. 1A), in contrast to the leukemic Jurkat cell line, which showed a growth reduction (Fig. 1B).

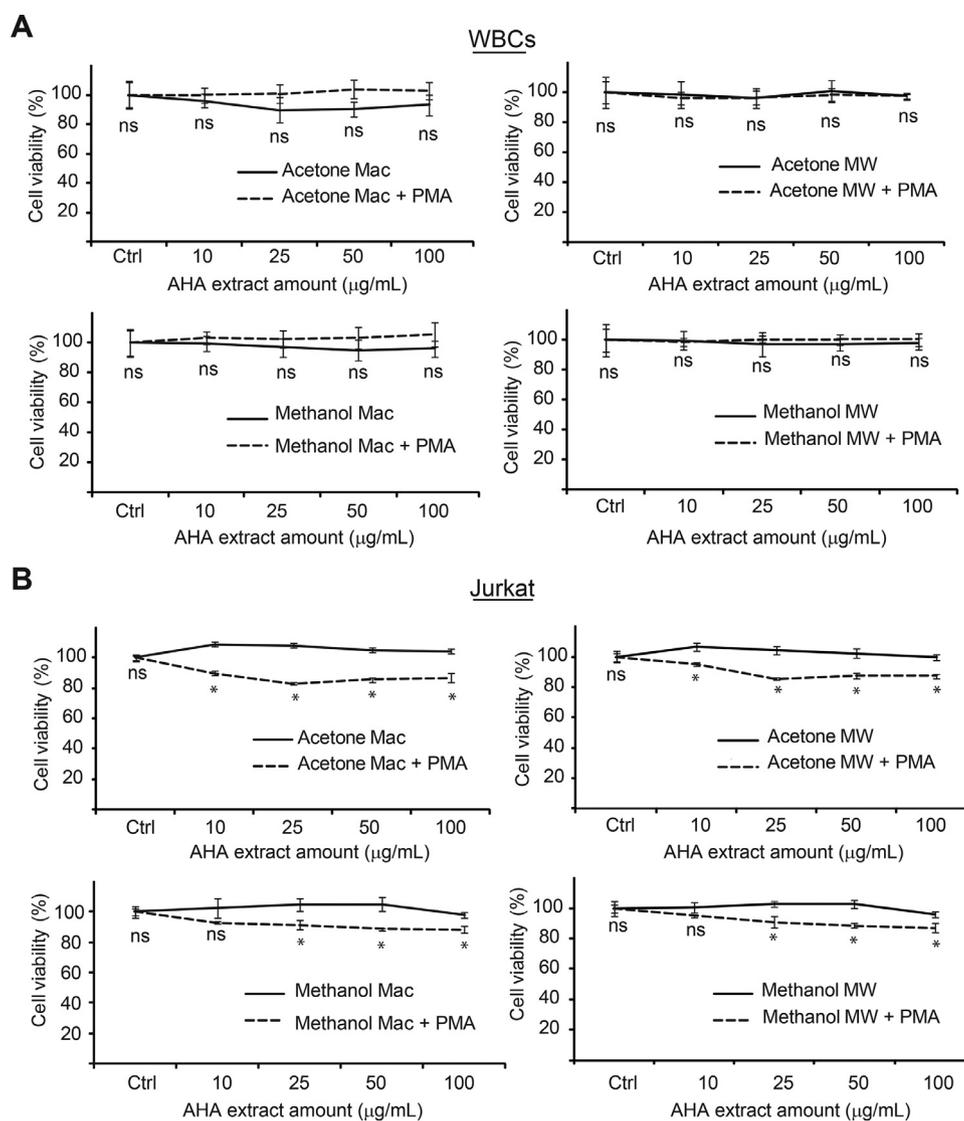


Fig. 1. Cell viability estimated by the resazurin assay in white blood cells (WBCs) and Jurkat cell line treated with *Artemisia herba-alba* extracts (AHA). (A) Cell viability of WBCs composed of monocytes and lymphocytes (1:1) treated with extracts alone or with phorbol myristate acetate (PMA). Upper panel, right: acetone maceration (Mac) extract; left acetone microwave (MW) extract. Lower panel, right methanol maceration extract (Mac); left methanol microwave (MW) extract. (B) cell viability of Jurkat cells treated with AHA extracts in same manner and shown as in A. Data are an average of 3 replicates \pm standard deviation (SD), and the statistical difference is significant if P -value < 0.05 or non-significant if P -value > 0.05 (ns).

Concordantly, in other cancer cells, AHA extracts used as AHA essential oils induced DNA damage and cell death (Tilaoui et al., 2015).

3.3. *Artemisia herba-alba* extracts, in vivo inhibitors of reactive oxygen species production

We measured ROS production using dihydrorhodamine 123 fluorescence in WBCs and Jurkat cell line. In agreement with cytotoxicity results obtained using PMA and AHA extracts (Fig. 1), and to test similarly for ROS inhibition using AHA extracts in the presence of PMA, we measured ROS levels in time course manner (up to 2 h) to follow intrinsic ROS inhibitory capacities of AHA extracts. We used methanol and acetone extracts for testing based on their high TPC levels. Maceration and microwave extraction methods were tested in parallel. WBCs incubated with PMA led to a high induction of ROS levels compared to untreated cells, ROS levels being induced smoothly after immediate PMA spike-in. Interestingly, incubation of WBCs with acetone or methanol extracts in the presence of PMA delayed the induction and reduction of ROS production (Fig. 2A). In comparison to WBCs, PMA-mediated ROS induction in Jurkat was quicker and stronger before reaching a plateau (Fig. 2B). Similarly, in

WBCs, PMA ROS induction was inhibited by AHA extracts before ROS levels reaching basal values observed in PMA untreated cells. In both cell types, the inhibitory effect of AHA extracts was dose-dependent, demonstrated by the decrease in the p -values following an increase in the concentration of AHA extracts (Fig. 2 and Supplemental Table 1). Additionally, the rate of ROS inhibition did not differ between the maceration and microwave extraction modes. We concluded that AHA extracts could reduce and block ROS production at high doses in living cells, suggesting beneficial properties of AHA consumption in preventing inflammatory syndromes. These observations are in agreement with the empirical usage of AHA in traditional medicine, treating bronchitis, and bowel infections. Infusions of *Artemisia herba-alba* were used to treat cough, intestinal pain, and diabetes (Khelifi et al., 2013).

3.4. *Artemisia herba-alba* extracts exert an anti-inflammatory effect via the mobilization of glutathione metabolism

To understand the role of AHA extracts in reducing PMA related inflammation, we investigated the modulation of glutathione metabolism at early and late time points without PMA. The similar behavior

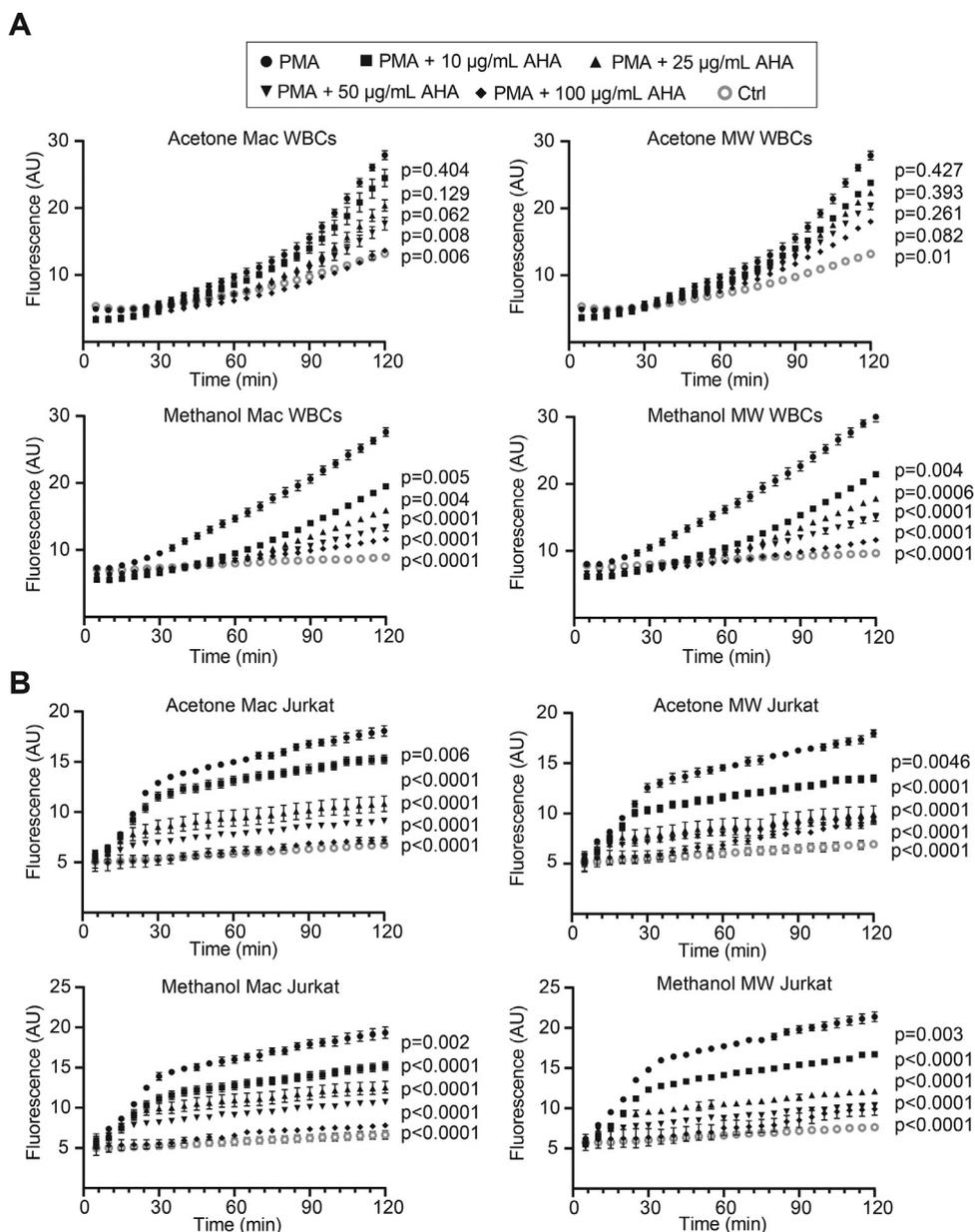


Fig. 2. Kinetic of reactive oxygen species (ROS) production in white blood cells (WBCs) and Jurkat cell line after treatments with different concentrations of *Artemisia herba-alba* extracts (AHA). (A) ROS level expressed as arbitrary units (AU) of fluorescence measured in WBCs composed treated with extracts alone or with phorbol myristate acetate (PMA). Upper panel, right: acetone maceration (Mac) extract; left acetone microwave (MW) extract. Lower panel, right Methanol maceration extract (Mac); left methanol microwave (MW) extract. (B) ROS level in Jurkat cell line treated with AHA extracts in same manner and as shown in A. Data are an average of 3 replicates \pm standard deviation (SD). The statistical significances were calculated using all kinetic data points, and WBC + PMA as a control. Mann-Whitney test was applied to each AHA doses or untreated cells (WBCs), and *P*-values were shown accordingly. The difference is significant if *P*-value < 0.05 or non-significant if *P*-value > 0.05 (ns).

of WBCs and Jurkat cells in ROS inhibition in the presence of AHA extracts prompts us to use Jurkat cells to study the kinetics of the antioxidant response following AHA extracts exposure, due to the difficulty in maintaining WBC in culture. We followed cellular response up to 72 h post-treatment with AHA extract without any PMA pre-treatment. Parameters of glutathione metabolism were analyzed by: (1) glutathione levels (GSH) and glutathione reductase (GR) enzymatic activity for redox status homeostasis; (2) analysis of glutathione transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) enzymatic activities; (3) total free thiol-proteins for assessing ROS detoxifying cell capacities. Methanol and acetone extracts from maceration and microwave extraction modes were evaluated, accordingly. Interestingly, incubation of Jurkat cells with macerated methanol AHA extracts at different concentrations, elevated GSH levels shortly after 1 h post-treatment (Fig. 3A, left panel) and was maintained up to 6 h

(Fig. 3A, right panel). The induction of GSH levels correlated well with GR activity, reinforcing the pool of reduced glutathione and detoxifying capacities. GST, GPx, and free protein thiols followed the same induction trend for GSH and GR. The concentration of 25 g/mL was the most efficient (Fig. 3A). However, parameters of the glutathione metabolism were not fully correlated with amounts of methanol AHA extracts added to the cells. Acetone macerated extracts induced as well as GSH levels and GR activity on a dose-dependent manner, but with much higher levels, of about 2.5 fold increase compared to methanol macerated extracts at 1 h (Fig. 3B, left panel), and was maintained over 6 h (Fig. 3B, right panel). GSH levels reached high and equal levels for all concentrations of acetone maceration extracts at 6 h post-treatment (Fig. 3B, right panel). The Activities of GST, GPx, and the free thiol protein contents followed the same increasing trend at each extract concentration, corroborating the induction of

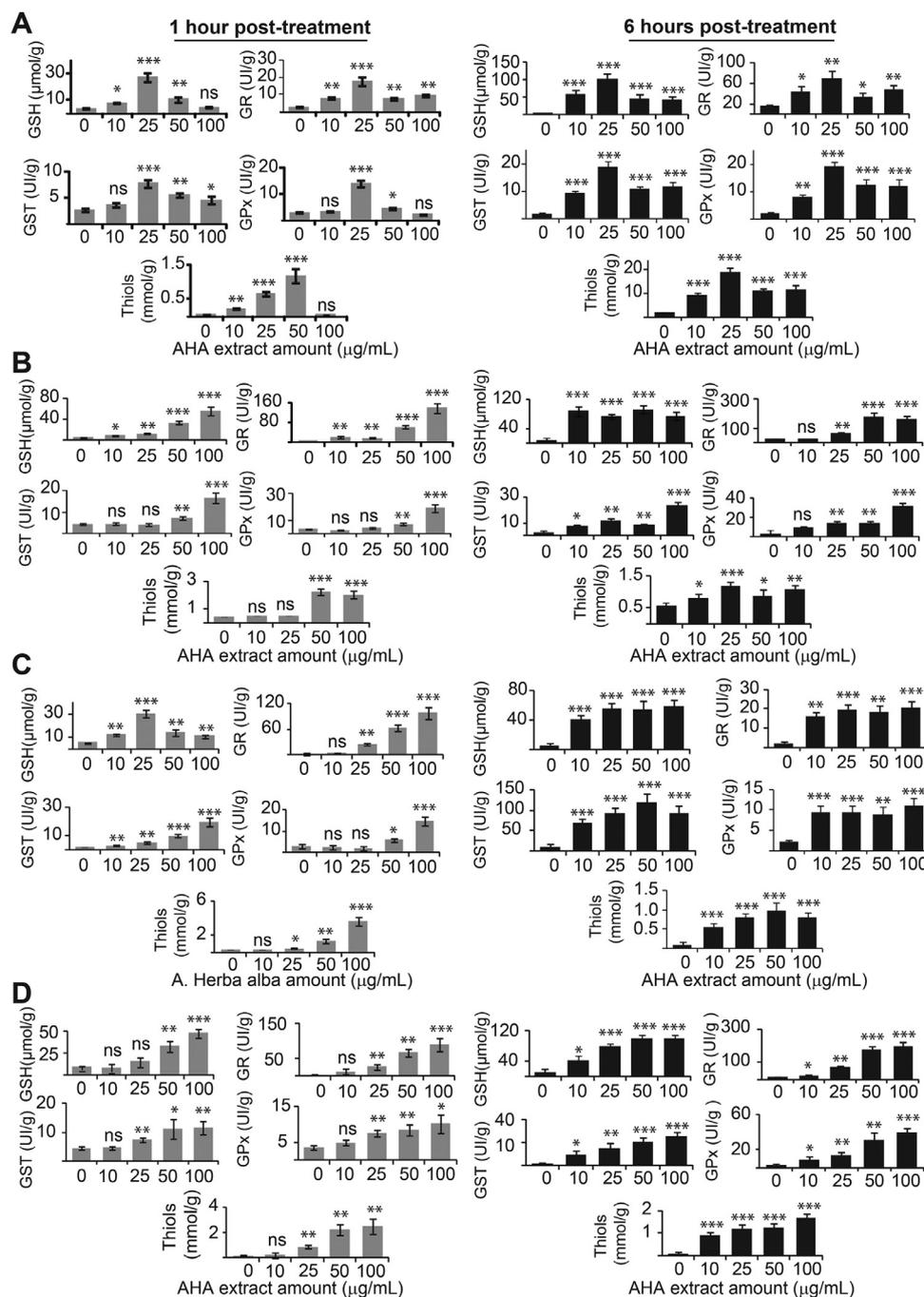


Fig. 3. Evaluation of glutathione metabolism in Jurkat cell line treated with different concentrations of *Artemisia herba-alba* extracts (AHA) for a short time period of 1 and 6 h post-treatments. (A) Redox status parameters of Jurkat treated with methanol maceration extracts; reduced glutathione (GSH) level, glutathione reductase (GR), glutathione transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) enzymatic activities and protein thiols (Thiols). Left panel, 1 h post-treatment (gray bars). Right panel, 6 h post-treatment (black bars). (B) Redox status of Jurkat treated with acetone maceration extracts, results as shown in A. (C and D) Redox status parameters of Jurkat treated with methanol and acetone microwave extracts for 1 and 6 h, results as shown in A and B, respectively. All measurements are an average of three replicates \pm standard deviation (SD), normalized to the total proteins content. The statistical significances shown as *P*-values indicated as non-significant (ns), or significant (* *p* < 0.05; ** *p* < 0.01; *** *p* < 0.001), calculated using AHA untreated cells as a control (0).

GSH levels, which remained similar to methanol extracts (Fig. 3B). After 6 h, acetone extracts in this case had a mild detrimental effect at high doses (100 g/mL), which changed moderately the free-thiol proteins pool (Fig. 3B, right panel). The concentration of 10 g/mL was enough to mobilize equal GSH content compared to higher concentrations. The discrepancy in cellular redox status parameters between methanol and acetone macerated extracts could be explained by the difference in extracts composition.

Taking in consideration these differences, we tested AHA microwave-assisted extracts from methanol and acetone for the

same parameters. Analysis of GSH levels and GR activities revealed that the concentration of 25 g/mL of methanol extract induces the highest values after 1 h incubation (Fig. 3C, left panel). Microwave methanol extracts of AHA led to a saturation effect of the cellular response for all parameters at 6 h of incubation following each concentration (Fig. 3C, right panel). Microwave acetone extracts induced a similar cell response as for acetone macerated extracts at 1 h with an increasing dose-effect after 6 h, without reaching saturation, for all redox status parameters (Fig. 3D). Both methanol and acetone microwave-assisted

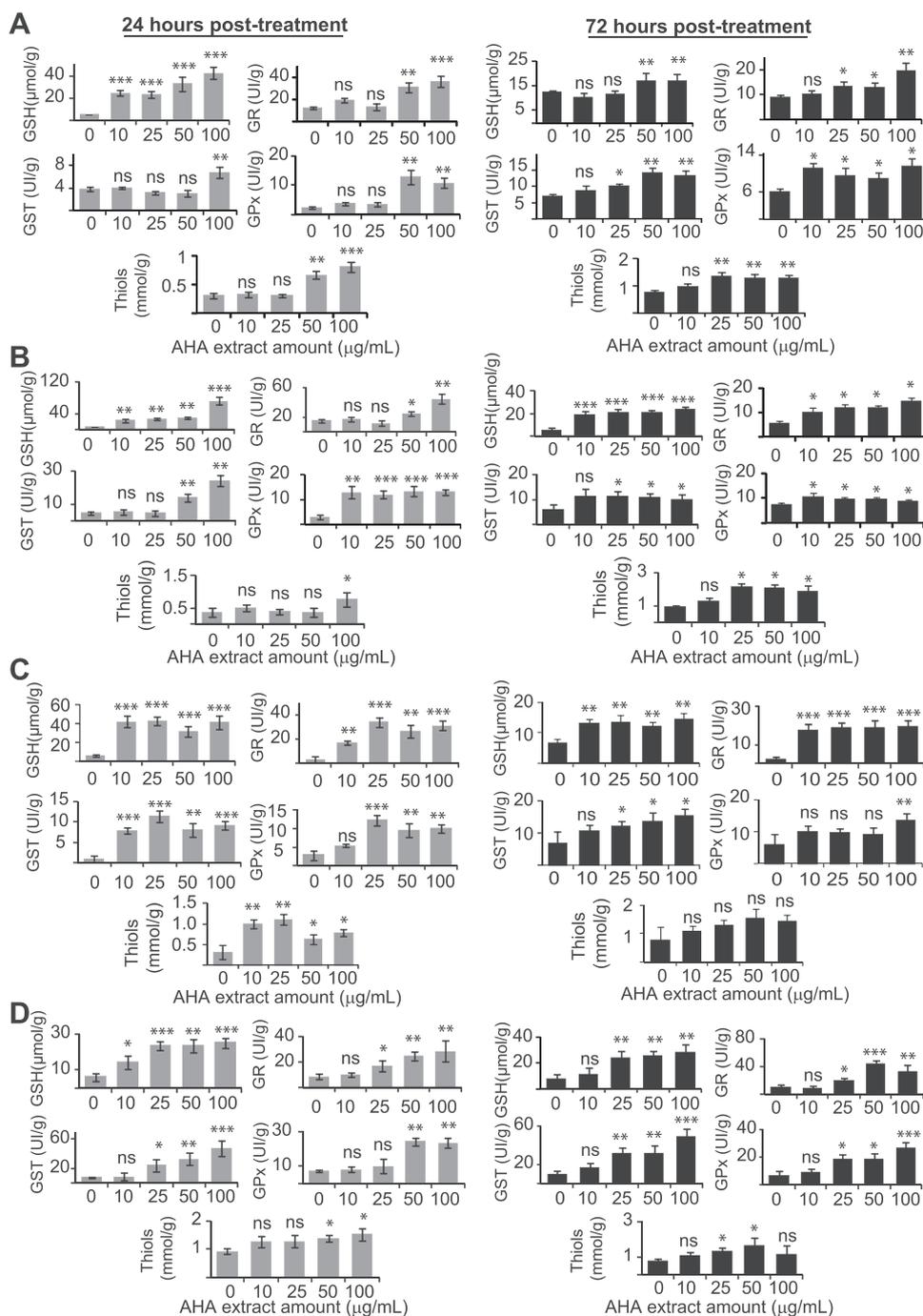


Fig. 4. Evaluation of glutathione metabolism in Jurkat cell line treated with different concentrations of *Artemisia herba-alba* extracts (AHA) for a longer period of 24 and 72 h post-treatments. (A) Redox status parameters of Jurkat treated with methanol maceration extracts; reduced glutathione (GSH) level, glutathione reductase (GR), glutathione transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) enzymatic activities and protein thiols (Thiols). Left panel, 24 h post-treatment (gray bars). Right panel, 72 h post-treatment (black bars). (B) Redox status parameters of Jurkat treated with acetone maceration extracts, results as shown in A. (C and D) Redox status parameters of Jurkat treated with methanol and acetone microwave extracts for 24 and 72 h, results as shown in A and B, respectively. All measurements are an average of three replicates \pm standard deviation (SD), normalized to the total proteins content. The statistical significance is shown as *P*-values indicated as non-significant $p > 0.05$ (ns), or significant ($* p < 0.05$; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$), calculated using AHA untreated cells as a control (0).

extracts were more potent in maintaining cellular response than maceration extracts.

To evaluate the cellular response at late time points following exposure of Jurkat cells to macerated methanol and acetone extracts, we measured parameters of cell redox status at 24 and 72 h. Methanol macerated extracts still stimulated GSH production and its recycling in a dose-dependent manner (Fig. 4A, left panel), with acetone macerated extracts reaching high levels at 100 mg/mL (Fig. 4B). Detoxifying GSH related capacities increased following in the same

trend after 24 h post-treatment. The kinetics of the stimulation pursued and maintained through all doses of AHA extracts and remained dose-dependent, before reaching a plateau at 72 h (Fig. 4A, right panel). Similarly, acetone macerated extracts showed the same kinetic at 24 h but with higher GSH mobilization and detoxifying capacities (Fig. 4B, left panel). Acetone macerated extracts maintained high levels of all redox status parameters up to 72 h, fold changes ranged from 2 to 4 (Fig. 4B, right panel). In contrast, methanol microwave extracts produced a high antioxidant response at 24 h

and remained unchanged at 72 h whatever the used doses (Fig. 4C). As expected acetone microwave extracts constantly maintained high levels of cellular redox status parameters, which continued to increase after 24 h (Fig. 4D, left panel) showing a dose-dependent pattern, reaching the saturation plateau only at 72 h (Fig. 4D, right panel). Concomitantly, acetone microwave extract at 100 g/mL might trigger cytotoxicity as levels of GST, GPx further increased but were followed by a reduction in free thiol proteins and GR activity. At a high dose of 100 g/mL in acetone extracts, permanent increase in GSH content was probably not sufficient to rebalance the redox status of the cells, which could trigger alternative cellular damage via lipid peroxidation and DNA damage because of the recurrence of a permanent oxidative stress in leukemic Jurkat cells.

Analysis of *in vitro* antioxidant capacities of AHA extracts using DPPH assay confirmed previous findings (Bourgou et al., 2017; Khlifi et al., 2013), with a stronger potency for microwave extracts. Both, white blood cells and Jurkat line treated with microwave-assisted and maceration extracts induced, and later blocked entirely in a dose-dependent ROS production. The primary ROS blocking effect is attributable to the presence of several anti-oxidant compounds such as flavonoids and polyphenols (Younsi et al., 2018). However, glutathione metabolism stimulation, which reinforces cell capacities against inflammatory triggers, dominates. For the long term, in the Jurkat cell line, the anti-inflammatory effect, evaluated by parameters of glutathione metabolism, indicated that microwave-assisted extracts have a long-lasting effect, maintained over 72 h. The explanation may reside in the differences in the content of the extracts. Alternatively, some cellular metabolic steps may generate other bioactive compounds from the extract, triggering in a cascade the cellular response, independently from ROS induction, reinforcing the beneficial health effects of AHA. A possible explanation is that consumed AHA extracts may have several beneficial effects depending on the metabolism; the study of the metabolism of AHA extracts will bring more evidence in this direction.

4. Conclusion

Artemisia herba-alba plant is used widely in different forms to treat several pathological syndromes in humans, based on empirical experiences and transmitted local knowledge. Here, our work provided more evidence for how the preventative action of AHA against chronic disorders or inflammation is mechanistically happening. The reinforcement of glutathione metabolism by AHA extracts instead, condition the cells to react faster and more potently against ROS and inflammatory circuits, following severe infections or exposure to environmental toxins (Pereira et al., 2013). Future investigations are needed to dissect the entire molecular mechanisms, and the fingerprints of all AHA extracts for evaluating bioactive molecules singly, by which GSH metabolism remains stimulated for longer times in the cells, and whether the human metabolism contributes to the emergence of novel entities. Our work reinforces the evidence for beneficial properties of AHA consumption in the Mediterranean population and provides evidence for more specific usage of AHA extracts.

Funding

Nadjet Bouchara was supported by a visiting scholarship from the Higher Ministry of Research and Education (Algeria). This work was supported by le comité de l'Allier de la Ligue nationale contre le cancer (France).

Data availability

The datasets used and/or analysed during this study are available from the corresponding author upon request. All data generated or analysed during this study are included in this published article.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no competing or financial interests.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Khelifa Arab for his scientific expertise and his careful language editing.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.sajb.2021.06.018.

References

- Abu-Darwish, M.S., Cabral, C., Goncalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Efferth, T., Salgueiro, L., 2015. *Artemisia herba-alba* essential oil from Buseirah (South Jordan): chemical characterization and assessment of safe antifungal and anti-inflammatory doses. *J. Ethnopharmacol.* 174, 153–160.
- Amri, I., De Martino, L., Marandino, A., Lamia, H., Mohsen, H., Scandolera, E., De Feo, V., Mancini, E., 2013. Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Artemisia herba-alba* growing wild in Tunisia. *Nat. Prod. Commun.* 8, 407–410.
- Arab, K., Rossary, A., Flourie, F., Tourneur, Y., Steghens, J. P., 2006a. Docosahexaenoic acid enhances the antioxidant response of human fibroblasts by upregulating gamma-glutamyl-cysteine ligase and glutathione reductase. *Br J Nutr* 95, 18–26.
- Arab, K., Rossary, A., Souler, L., Steghens, J. P., 2006b. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *Br J Nutr* 96, 811–819.
- Booth, D.M., Murphy, J.A., Mukherjee, R., Awais, M., Neoptolemos, J.P., Gerasimenko, O.V., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., Sutton, R., Criddle, D.N., 2011. Reactive oxygen species induced by bile acid induce apoptosis and protect against necrosis in pancreatic acinar cells. *Gastroenterology* 140, 2116–2125.
- Bourgou, S., Bettaieb Rebey, I., Mkadmini, K., Isoda, H., Ksouri, R., Ksouri, W.M., 2017. LC-ESI-TOF-MS and GC-MS profiling of *Artemisia herba-alba* and evaluation of its bioactive properties. *Food Res. Int.* 99, 702–712.
- Cereser, C., Guichard, J., Draï, J., Bannier, E., Garcia, I., Boget, S., Parvaz, P., Revol, A., 2001. Quantitation of reduced and total glutathione at the femtomole level by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: application to red blood cells and cultured fibroblasts. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 752, 123–132.
- Craig, W.J., 1999. Health-promoting properties of common herbs. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 491S–499S.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97, 654–660.
- Folin, O., Denis, W., 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *Journal of Biological Chemistry* 12, 239–243.
- Folin, O., Ciocalteu, V., 1929. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of biological chemistry* 73, 627–650.
- Himmelfarb, J., McMonagle, E., McMenamin, E., 2000. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int.* 58, 2571–2578.
- Khlifi, D., Sghaier, R.M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., Bouajila, J., 2013. Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalapensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food Chem. Toxicol.* 55, 202–208.
- Mahbouli, S., Talvas, J., der Vartanian, A., Ortega, S., Rouge, S., Vasson, M.P., Rossary, A., 2018. Activation of antioxidant defences of human mammary epithelial cells under leptin depend on neoplastic state. *BMC Cancer* 18, 1264.
- Meda, N.R., Fraisse, D., Gnoula, C., Vivier, M., Felgines, C., Senejoux, F., 2017. Characterization of antioxidants from *Detarium microcarpum* Guill. et Perr. leaves using HPLC-DAD coupled with pre-column DPPH assay. *Eur. Food Res. Technol.* 243, 1659–1666.
- Messaoudene, D., Belguendouz, H., Ahmedi, M.L., Benabdekader, T., Otmani, F., Terahi, M., Youinou, P., Touil-Boukoffa, C., 2011. *Ex vivo* effects of flavonoids extracted from *Artemisia herba alba* on cytokines and nitric oxide production in Algerian patients with Adamantiades-Behcet's disease. *J. Inflamm.* 8, 35 (Lond).
- Ostergaard, H., Tachibana, C., Winther, J.R., 2004. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J. Cell Biol.* 166, 337–345.
- Pereira, R.B., Sousa, C., Costa, A., Andrade, P.B., Valentao, P., 2013. Glutathione and the antioxidant potential of binary mixtures with flavonoids: synergisms and antagonisms. *Molecules* 18, 8858–8872.
- Petrovska, B.B., 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.* 6, 1–5.
- Quezel, P., Santa, S., 1962. *New Flora of Algeria and Meridional Desertic Regions*. CNRS, Paris, Franc. in French.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B., 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* 22, 375–383.

- Said Mel, A., Militello, M., Saia, S., Settanni, L., Aleo, A., Mammina, C., Bombarda, I., Vanloot, P., Rousset, C., Dupuy, N., 2016. *Artemisia arborescens* essential oil composition, enantiomeric distribution, and antimicrobial activity from different wild populations from the mediterranean area. *Chem. Biodivers.* 13, 1095–1102.
- Saleh, M.A., Belal, M.H., el-Baroty, G., 2006. Fungicidal activity of *Artemisia herba alba* Asso (Asteraceae). *J. Environ. Sci. Health B* 41, 237–244.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M., 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology* 299, 152–178.
- Tilaoui, M., Ait Mouse, H., Jaafari, A., Ziad, A., 2015. Comparative phytochemical analysis of essential oils from different biological parts of *Artemisia herba alba* and their cytotoxic effect on cancer cells. *PLoS ONE* 10, e0131799.
- Younsi, F., Rahali, N., Mehdi, S., Boussaid, M., Messaoud, C., 2018. Relationship between chemotypic and genetic diversity of natural populations of *Artemisia herba-alba* asso growing wild in Tunisia. *Phytochemistry* 148, 48–56.

Supplemental table 1: Statistical analysis Summary of the kinetic ROS inhibition by AHA extracts in WBCs and Jurkat

WBCs

Mann-Whitney test of Acetone Maceration (Mac)

Ctrl = WBCs + PMA ($\mu\text{g/mL}$)	10	25	50	100	WBCs
P value	0.404	0.129	0.062	0.008	0.006
P value summary	ns	ns	ns	**	**

Mann-Whitney test of Methanol Maceration (Mac)

Ctrl = WBCs + PMA ($\mu\text{g/mL}$)	10	25	50	100	WBCs
P value	0.0051	0.0004	<0.0001	<0.0001	<0.0001
P value summary	**	***	***	***	***

Mann-Whitney test of Acetone Microwave (MW)

Ctrl = WBCs + PMA ($\mu\text{g/mL}$)	10	25	50	100	WBCs
P value	0.428	0.393	0.262	0.008	0.010
P value summary	ns	ns	ns	**	**

Mann-Whitney test of Methanol Microwave (MW)

Ctrl = WBCs + PMA ($\mu\text{g/mL}$)	10	25	50	100	WBCs
P value	0.004	0.001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
P value summary	**	***	***	***	***

JURKAT

Mann-Whitney test of Acetone Maceration (Mac)

Ctrl = Jurkat cells + PMA (µg/mL)	10	25	50	100	WBCs
P value	0.006	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
P value summary	**	***	***	***	***

Mann-Whitney test of Methanol Maceration (Mac)

Ctrl = Jurkat cells + PMA (µg/mL)	10	25	50	100	WBCs
P value	0.002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
P value summary	**	***	***	***	***

Mann-Whitney test of Acetone Microwave (MW)

Ctrl = Jurkat cells + PMA (µg/mL)	10	25	50	100	WBCs
P value	0.005	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
P value summary	**	***	***	***	***

Mann-Whitney test of Methanol Microwave (MW)

Ctrl = Jurkat cells + PMA (µg/mL)	10	25	50	100	WBCs
P value	0.003	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
P value summary	**	***	***	***	***

Résumé :

Artemisia herba-alba (AHA) est une plante médicinale connue pour ses capacités préventives contre les maladies chroniques. L'inflammation est une réponse cellulaire naturelle à des stimuli nocifs, et l'inflammation aiguë et chronique est impliquée dans les troubles humains. La prévention et la limitation de l'impact négatif de l'inflammation par l'utilisation de phytoconstitués ont attiré beaucoup d'attention. Ici, nous montrons que les extraits d'AHA sont des produits anti-inflammatoires puissants à faibles doses dans les globules blancs, traités avec de phorbol myristate acétate (PMA), un déclencheur pro-inflammatoire. Quel que soit le mode d'extraction, c'est-à-dire macération ou micro-ondes, tous les extraits ont réduit de manière dose-dépendante la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les globules blancs et la lignée cellulaire cancéreuse leucémique Jurkat. L'induction de l'effet anti-inflammatoire a été évaluée par la mesure du métabolisme du glutathion (glutathion réductase, transférase, et peroxydase), et des protéine-free-thiols dans les cellules cancéreuses Jurkat. Les cellules Jurkat incubées avec des extraits d'AHA faiblement ou fortement concentrés, allant de 10 à 100 g/mL, ont induit une réponse cellulaire rapide mesurée à une et six heures. Nos extraits améliorent directement la réponse cellulaire anti-inflammatoire, d'abord *via* l'induction des ERO. Plus tard, cependant, elle est vigoureusement maintenue, indépendamment des ERO, ce qui suggère l'intervention du métabolisme cellulaire dans l'amélioration de ces effets. Nous avons aussi fait une caractérisation de nos extraits. Compte tenu du potentiel préventif et anti-inflammatoire de l'AHA, une consommation régulière est conseillée, et les applications phytothérapeutiques sont encouragées pour traiter les inflammations locales.

Mots clés : *Artemisia herba-alba*, Glutathion, Jurkat, molécules bioactives, anti-inflammatoire.

Abstract :

Artemisia herba-alba (AHA) is a medicinal plant known for its preventive capacities against chronic diseases. Inflammation is a natural cellular response to harmful stimuli, and both acute and chronic inflammation is implicated in human disorders. The prevention and limitation of the negative impact of inflammation through phytoconstituents have attracted much attention. Here, we show that AHA extracts are potent anti-inflammatory drugs in white blood cells at low doses, treated with phorbol myristate acetate (PMA), a pro-inflammatory trigger. Regardless of the extraction method, i.e. maceration or microwave, all extracts dose-dependently reduced the production of reactive oxygen species (ROS) induced by the pro-inflammatory PMA in white blood cells and the Jurkat leukemic cancer cell line. The induction of the anti-inflammatory effect was evaluated by measuring the metabolism of glutathione (glutathione reductase, transferase, and peroxidase) and protein-free-thiol in Jurkat cancer cells. Jurkat cells incubated with weakly or highly concentrated AHA extracts, ranging from 10 to 100 g / mL, induced a rapid cellular response measured at one and six hours. Interestingly, microwave extracts showed more robust induction, 5-10 times greater at early time points, and sustained for 72 hours. On the other hand, extracts of AHA showed a moderate anti-proliferative effect in the Jurkat leukemia line. We concluded that AHA extracts directly enhance the anti-inflammatory cellular response, first via the induction of ROS. Later, however, it is vigorously maintained, independent of ROS, suggesting the intervention of cellular metabolism in ameliorating these effects. Considering the preventive and anti-inflammatory potential of AHA, regular consumption is advised, and herbal medicine applications are encouraged to treat local inflammations.

Keywords: *Artemisia herba-alba*, Glutathione, Jurkat, bioactive molecules, anti-inflammatory.

الملخص :

أرتميسيا هيربا ألبا (AHA) علاج عشبي معروف بقدراته الوقائية ضد الأمراض المزمنة كالتهاب وهو استجابة خلوية طبيعية للمنبهات الضارة، ويتورط الالتهاب الحاد والمزمن في الاضطرابات البشرية. حيث ان استخدام المركبات النباتية يجذب الكثير من الاهتمام، ولقد اجتذبت للوقاية والحد من التأثير السلبي للالتهاب هنا، نظهر أن مستخلصات AHA هي عقاقير فعالة ومضادة للالتهابات بجرعات منخفضة في خلايا الدم البيضاء، وتعامل مع phorbol myristate acetate (PMA)، وهو محفز للالتهابات. بغض النظر عن طريقة الاستخراج، أي النقع أو الميكروويف، فإن جميع المستخلصات تعتمد على الجرعة في تقليل إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلي (ROS) في خلايا الدم البيضاء وخط خلايا سرطان الدم Jurkat اللوكيميا. تم تقييم تحريض التأثير المضاد للالتهابات عن طريق قياس التمثيل الغذائي للجوتاثيون (الجوتاثيون اختزال، ترانسفيراز، والبيروكسيداز)، والثيول الخالي من البروتين في خلايا Jurkat السرطانية. خلايا الجوركات المحتضنة بمستخلصات ضعيفة أو عالية التركيز من AHA، تتراوح من 10 إلى 100 جم / مل، تسببت في استجابة خلوية سريعة تم قياسها في غضون ساعة إلى ست ساعات تعمل مستخلصاتنا بشكل مباشر على تحسين الاستجابة الخلوية المضادة للالتهابات، أولاً عن طريق تحريض الأكسجين التفاعلي وفي وقت لاحق، مع ذلك، يتم الحفاظ عليه بقوة، بغض النظر عن الأكسجين التفاعل، مما يشير إلى تدخل التمثيل الغذائي الخلوي في تخفيف هذه التأثيرات. لقد قمنا أيضاً بتوصيف مقتطفاتنا بالنظر إلى الإمكانيات الوقائية والمضادة للالتهابات لـ AHA، يُنصح بالاستهلاك المنتظم، ويتم تشجيع تطبيقات الأدوية العشبية لعلاج الالتهابات الموسمية.

الكلمات المفتاحية :

مضاد التهاب الجزيئات النشطة بيولوجياً، Jurkat، الجوتاثيون أرتميسيا هيربا ألبا .