



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine Des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Analyse et contrôle de qualité

Thème

**La purification du collagène type II et l'effet
antiarthritique de Marrubium vulgare chez les rats
Wistar**

Présenté par :

BAHLOULI Naziha

ZITOUNI Amina

Devant le jury :

Président : M^r Aliat Toufik MAA (Univ BBA)

Encadrant : M^r Diafat Abdelwahab MCB (Univ BBA)

Examineur 1 : M^r Akbache Abedrezak MCB (Univ BBA)

Examineur 2 : M^r Meribai Abdelmalek MAA (Univ BBA)

Année universitaire : 2014/2015

Remerciement

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

Un spécial remerciement à nos directeur de thèse, docteur Diafet Abdelwahab, qui n'a aucun ménagé aucun effort pour nous aider, ses conseils judicieux, et pour nous encouragé dans la concrétisation de ce travail, et nous tenons à remercier pour sa disponibilité et son respect au cours de l'élaboration Il nous déléguer plusieurs responsabilités dont nous espérons avoir été à la hauteur.

Nous exprime tous nos remerciements à l'ensemble des membres jurys qui nous fait l'honneur de participer au Jury de soutenance, pour sa participation scientifique ainsi que le temps qu'il ont consacré à recherche.

Nous avons remercie Selma bahlouli pour son aide dans notre étude.

*Nous tenons aussi a remercie l'ensemble des techniciens de laboratoire de biochimie , chimie et microbiologie surtout (Amirouch , Sabrina et khalil), pour leur gentillesse et leur aide durant la période que nous avons passé dans
laboratoire*

Nous tenons également à remercier nos parents et nos frères et sœurs : leurs précieux conseils et leurs aident et qui ont supporté nos préoccupation et nos stress durant toute la période du travail.

Nous adressons toute nous gratitude à tous mes amis et toutes personnes qui nous aidons dans la réalisation de ce travail.

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie que je dédie ce travail à mes chers parents en particulier qui ont Sacrifié leur vie pour ma réussite et m'ont éclairé le chemin par leurs conseils judicieux, j'espère un jour je pourrai leur rendre un peu de ce qu'il ont fait pour moi , que dieu leur prête bonheur et longue vie et merci d'avoir fait de moi la princesse de votre royaume.

A celle qui ont coloré ma vie par leurs sourires, par leurs esprits. ...mes trois sœurs :« dahbia, kahina, farida»

Je dédie aussi ce travail a ma grande-mère que j'aime et mon adorable oncle«Abd el rahmen»

A ma meilleure amie« feriel »que j'aime et laquelle j'ai souris et à sa famille.

A tous mes amis je vous remercie de votre patience vous m'avez toujours aidé.

A ma chandelle avec qui j'ai passé des moments inoubliables , ma chère amie« naziha».

Merci d'être à mes cotés dans les plus dures moments.

A toute personne que n'ai pas cité et qui m'a aidé de prés ou de loin , je vous remercie .

Amina zitouni

Dédicace

Je dédie se mémoire à mes parents Bahlouli Nadir et Bahlouli Rabia pour leur confiance, leur soutint, leur encouragement, leur amour qui me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je vous aime.

A mes chers frères et sœurs fares ,akram , Amina, soumia et Moufida

A mes chers amis Mimouna, Narimane, Chahinez, Wissem, Wafa, Amina, Hiba et Asma.

A mes grandes pères Bahlouli abdelkader et Bahlouli Mouhamed et mes grandeS mèreS Bahlouli Larem et Bahlouli Oumkeltoum

A tous mes oncles, tantes, cousins et cousines

A tous la famille Bahlouli

Et tous ceux qui ont aidés dans ce travail de près ou de loin.

Naziha

Bahlouli

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : Les compléments alimentaires

I .1. Définition D'un complément alimentaire	2
I .1.1. Les vitamines et les minéraux.....	2
I .1. 2. Les plantes	2
I .1. 3. Les substances à but nutritionnelles ou biologiques	3
I.1.2. Le collagène.....	3
I.2.1. Généralité sur le collagène.....	3
I.2.1.1 Définition du collagène	3
I.2.1.2. Familles et types du collagènes.....	4
I.2.1.3. Structure du collagène	5
I.2.2.Origine du collagène	6
I.2.3.Rôle du collagène	6
I.2.4.Utilisation du collagène	7

Chapitre II : Le collagène type II

II.1. Le collagène type II.....	8
II.1.1 Définition du collagène type II.....	8
II.1.2.Synthèse du collagène type II.....	8
II.1.3.Origine du collagène de type II.....	9
II.1.4.Utilisation du collagène de type II.....	10
II.1.4.1.Utilisation biomédicales et pharmaceutiques.....	10
II.1.4.2.Utilisation dans les produits alimentaires.....	10
II.1.4.3.Utilisation dans les produits cosmétiques.....	10
II.1.4.4.Utilisation dans la provocation de l'arthrite.....	10
II.2.La polyarthrite rhumatoïde	10
II.2.1.L'origine de la polyarthrite rhumatoïde.....	11
II.2.2.Les manifestations immunologiques.....	11
II.2.3. Les signes cliniques de la Polyarthrite rhumatoïde	12
II.2.4.Le traitement médicamenteux de l'arthrite.....	12
II.2.4.1.Traitements symptomatiques.....	13
II.2.4.2.Les traitements du fond.....	13
II.2.4.3.La biothérapie.....	13
II.2.5. Traitement de PR par les plantes médicinales.....	13
II.2.5.1.Griffe du diable ou harpagophyton	14
II.2.5.2.Saule.....	14
II.2.5.3.Poivre de Cayenne Piment.....	14
II.2.6. Marrubium vulgare.....	14
II.2.6.1. Systématique de la plante.....	14
II.2.6.2.Utilisation traditionnelle de la Marrubie.....	15

Chapitre III : Matériels et méthodes

I. Matériels et méthodes.....	16
I.1. Matériels.....	16
1.1.1. la matière première.....	16
I.1.1.1. Le cartilage de poulet.....	16
1.1.2. La plante	16
I.1.2.1. Les animaux.....	17
1.1.3. Produits et réactifs.....	17
III.2. Méthodes.....	17
III.2.1. La purification du collagène type II.....	17
III.2.1.1. la première étape	18
III.2.1.2. la deuxième étape.....	18
III.2.1.3. la troisième étape.....	19
III.2.1.4. la quatrième étape.....	19
III.2.1.5. la cinquième étape	20
III.2.1.6. la sixième étape	20
III.2.2. Analyse du collagène	22
III.2.2.1. Le spectre d'absorption en UV-Visible	22
III.2.2.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford.....	22
III.2.2.2.1. Principe	22
III.2.2.2.2. La Préparation d'une gamme d'étalonnage.....	22
III.2.2.3. La détermination de la pureté du CII par SDS-PAGE.....	23
III.2.2.3.1. Préparation des gels..	24
III.2.2.3.2. Solubilisation des échantillons.....	25
III.2.2.3.3. La migration..	25
III.2.2.3.4. Coloration des gels.	25
III.2.2.3.5. Décoloration des gels.....	25
III.2.3. L'activité arthritogène du collagène.....	26
III.2.3.1. La provocation de l'arthrite.....	26
III.2.3.2. Evaluation des signes cliniques de l'arthrite.....	26
III.2.3.2.1. Le poids corporel.....	27
III.2.3.2.2. Examen sanguin.....	27
III.2.3.2.2.1. Le prélèvement du sang	27
III.2.3.2.2.1.2. La vitesse de sédimentation des globules rouges.....	28
III.2.3.2.2.1.2.1. L'hémogramme FNS	28
III.2.4. Traitement de l'arthrite par la plante « Marrubie »	28
III.2.4.1. Extraction de la plante « Marrubie »	28
III.2.4.2. Administration de l'extrait de Marrubie.....	29
III.2.4.3. Prélèvement du sang.....	29

Chapitre IV Résultats et Discussion

IV. Résultats.....	30
IV.1. Le rendement de purification	30
IV.2. La pureté du collagène.....	30
IV.2.1. Le spectre d'absorbance en UV.....	30
IV.2.2. Le degré de pureté de CII par électrophorèse (SDS -PAGE)	31

IV.3.Le dosage de taux des protéines	32
IV.4.L'activité biologique du collagène.....	32
IV.4.1.L'incidence de l'arthrite.....	32
IV.4.2.les signes cliniques de l'arthrite.....	33
IV.4.3.L'arthritic score	34
IV.4.4.Evaluation du poids des rats.....	34
IV.4.5.Nombre des pattes arthritiques.....	35
IV.4.6. Examen sanguin.....	35
IV.4.6.1 La vitesse de sédimentation.....	35
IV.4.6.2 Nombre des GB.....	36
IV.5.Effet curatifs de l'extrait éthanolique de Marrubie.....	36
IV.5.1.Score de l'arthrite.....	36
IV5.2.Examen sanguin.....	37
IV.5.2.1. Nombre des GB.....	37
Discussion	39
Conclusion.....	41
Références bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

Liste des figures

Figures	Titre	Pages
Figure N° 1	Structure du collagène	6
Figure N° 2	Synthèse du collagène II	9
Figure N° 3	Réaction inflammatoire de polyarthrite rhumatoïde	11
Figure N° 4	Espèce Marrubium vulgare	15
Figure N° 5	Cartilage de poulet	16
Figure N° 6	Marrube blanc	16
Figure N° 7	Les rats Albinos Wistar	17
Figure N° 8	Le périchondre	18
Figure N° 9	le cartilage rassemblé	19
Figure N°10	le CII soluble et les résidus non solubles	19
Figure N°11	les boudins de dialyse	20
Figure N° 12	le collagène final	21
Figure N° 13	Electrophorèse	24
Figure N° 14	Administration intradermique	26
Figure N° 15	Prélèvement du sang à partir de la veine de sinus rétro-orbital	27
Figure N° 16	Filtration et Evaporation de Marrubie	29
Figure N° 17	Spectre d'absorbance de collagène II purifié	30
Figure N° 18	Spectre d'absorbance de collagène (sigma)	31
Figure N° 19	Profil électrophorétique de SDS-PAGE pour le CII purifié et le collagène sigma.	31
Figure N° 20	La courbe d'étalonnage selon la méthode de Bradford(1967)	32
Figure N° 21	Les signes cliniques observés après le 14ème jour de l'induction de l'arthrite par le CII	33
Figure N° 22	Evaluation de la sévérité de l'arthrite	34
Figure N° 23	Variation de poids corporel des rats avant et après l'induction de l'arthrite	34
Figure N° 24	Nombre des pattes atteints par l'arthrite dans le groupe arthritique	35
Figure N° 25	VS après 21 jours de l'administration de CII	36
Figure N° 26	Taux des globules blancs des groupes arthritiques et témoins	36
Figure N° 27	Evaluation de traitement de la plante	37
Figure N° 28	Le taux des GB des groupes traités et témoins positif	38

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Pages
Tableau I	Les familles et types du collagènes	4
Tableau II	La gamme d'étalonnage	23
Tableau III	Composition de gel d'électrophorèse	24
Tableau IV	Tampon d'échantillon	25

La liste des abréviations

µl	: Microlitre
AA	: Acide acétique
ACF	: adjuvant complet de Freund
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AIF	: adjuvant incomplet de Freund
AINS	: Anti-inflammatoires non stéroïdiens
Anti-CCP	: Facteur rhumatoïde et anticorps
BSA	: Albumine Bovine Sérum
CBB	: Colorant bleu Brilliant de Coomassie
CII	: Collagène de type 2
EDTA	: Éthylène Diamine Tétracétique
ESB	: Encéphalopathie Spongiforme Bovine
FACIT	: Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helix
FACIT	: Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helixes
FNS	: Formule numération sanguine
GB	: Globules blancs
Gly	: Glycine
H	: Heur
HLA	: Antigènes des leucocytes humain
Hyp	: Hydroxyproline
Ig	: Immunoglobuline
IL	: Interleukin
IL-1	: Interleukine-1
LB	: Lymphocyte B
Leu	: Leucine
LT	: Lymphocyte T
Lys	: Lysine
M	: Molaire
MEC	: Matrice extracellulaire
Met	: Méthionine

Na₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de sodium
NaCl : Chlorure de sodium
Nm : Nanometre
pH : Potentiel hydrogène
Phe : Phénylalanine
PR : Polyarthrite rhumatoïde
Pro : Proline
rmp : Rotation par minute
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Ser : Sérine
Ser : Sérine
TEMED : tétraéthylméthyldiamide
TNF α : Facteur de nécrose tumorale
UV : Ultraviolet-visible
VS : Vitesse de sédimentation

Introduction

Les compléments alimentaire sont toutes molécules ou substances qui complète l'alimentation, et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés(vitamines, minéraux, acides gras ou acides aminés et plusieurs substances d'origine animales ou végétales). Les compléments alimentaires révèlent des effets bénéfiques sur la santé,le collagène classé comme un supplément alimentaire intéressant à cause de leur propriété bioactive.

Le collagène est une protéine fibreuse représente 30 % des protéines de l'organisme, il est également ubiquitaire dans un nombre important de tissus d'un même organisme où il assure une protection mécanique et confère aux tissus ses propriétés de rigidité et d'élasticité. Il existe plusieurs types de collagène, mais le plus abondant c'est le collagène type II(CII), qui représente plus de 90% de tout le contenu du cartilage.

Le collagène II est largement utilisé dans les produits alimentaires (émulsifiant), pharmaceutiques (l'enrobage des comprimés), cosmétiques (shampooing). Son utilisation s'étend encore dans la recherche médicale de l'arthrite.

L'objectif de notre étude consiste à effectuer la purification du collagène type II pure et actif sur le plan biologique (arthritogène), et le traitement de l'arthrite par l'extrait éthanolique de Marrubie

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la purification du collagène mais ces méthodes présentent des inconvénients tels que l'obtention de collagène type II inactif sur le plan biologique et immunologique, et le traitement de l'arthrite par l'extrait éthanolique de Marrubie

Notre recherche est constituée de 2 parties :

La première partie est une analyse bibliographique qui porte une généralité sur le collagène, collagène type II, Les manifestations immunologiques de la PR et le traitement de PR.

La deuxième partie expérimentale qui porte sur la purification du CII, et la détermination de la pureté et l'activité biologique de cette molécule, ainsi que le traitement de l'arthrite par une plante médicinale le Marrubie.

I.1. Définition D'un complément alimentaire

La directive N°2002/46/CE permet d'établir une définition complète et commune des compléments alimentaires au niveau européen, d'après ce décret, on entend par "compléments alimentaires" ,« les denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis de compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité» .

En vertu de cette directive, les suppléments alimentaires sont différenciés en trois familles pouvant intégrer : les vitamines et minéraux, les plantes et les substances à but nutritionnels ou biologiques

I.1.1. Les vitamines et les minéraux

Les vitamines et minéraux constituent une famille essentielle dans les compléments alimentaires, et sont les plus consommées (Caro et *al.*, 2010).

Les vitamines ne sont pas synthétisées par notre organisme (à l'exception de la vitamine D), on les retrouve dans notre alimentation. Ils sont extraient à partir d'aliments et les concentrent sous différentes formes pharmaceutiques(comprimés, gélules, solutions buvables...). Les vitamines utilisées dans la fabrication des compléments alimentaires sont : Vitamines A, D, E, K, B1 ,B2, B6, B12 et C, la Niacine, l'Acide pantothénique, l'Acide folique et la Biotine (Caro et *al.*, 2010).

Les minéraux utilisés dans la fabrication des compléments alimentaires sont le Calcium, le Magnésium, le Fer, le Cuivre, l'Iode, le Zinc, le Manganèse, le Sodium, le Potassium, le Sélénium, le Chrome, le Molybdène, le Fluorure, le Chlorure, le Phosphore (Caro et *al.*, 2010).

I.1.2. Les plantes

L'utilisation des plantes pour leurs propriétés sur la santé remonte à l'antiquité et est ancrée dans toutes les cultures. Les plantes à usage traditionnel détiennent une place importante dans les ingrédients utilisés dans les compléments alimentaires (Caro et *al.*, 2010).

Les utilisations de plantes dans les compléments alimentaires s'appuient sur des usages traditionnels (poudres, extraits secs ou aqueux) ou sur des techniques d'extraction plus modernes permettant l'obtention de substances isolées de plantes (Caro et *al.*, 2010).

I.1.3. Les substances à but nutritionnel ou biologique

La biotechnologie est une nouvelle source considérable d'ingrédients de compléments alimentaires. Il y a de plus en plus de substances innovantes faisant l'objet d'études cliniques publiées dans des revues spécialisées (Caro et *al.*, 2010). Exemples: les omégas 3, les probiotiques ou glucosamine (Messer., 2012).

Les compléments alimentaires révèlent des effets bénéfiques sur la santé (Zague et *al.* 2011). Selon Alemán et Martínez-Alvarez (2008) le collagène est classé comme un supplément alimentaire intéressant à cause de leur propriété biocative. Cette protéine est une composante primaire de tissu conjonctif, elle est couramment utilisés dans divers domaines, y compris les produits alimentaires, cosmétiques, et industries biomédicale. Les plus importants sources de cette molécule bioactive sont les bovines (Zague et *al.*, 2011) et les poissons (Alemán et Martínez-Alvarez ,2008), le sternal cartilage des poulets est également une bonne source de CII (Edward et *al.*,1996).

I.2. Le collagène

I.2.1. Généralité sur le collagène

La matrice extracellulaire (MEC) est un ensemble complexe de molécules entourant les cellules dans les tissus des mammifères. Elle est principalement composée de molécules de collagène et d'élastine qui lui confèrent respectivement ses propriétés de rigidité et d'élasticité, mais aussi d'autres molécules comme la fibrilline, la fibronectine, la laminine ou encore les protéoglycanes qui servent de renfort aux deux premières protéines, mais aussi à créer des liens entre les cellules. La MEC est une structure active qui joue un grand rôle dans l'interaction des cellules entre elles. Elle peut, par exemple, servir à stocker des protéines et des facteurs de croissance pour les libérer en cas de besoin (Taipale et Keski-Oja, 1997).

I.2.1.1. Définition du collagène

Le terme de « collagène » est à l'origine d'un néologisme de la langue française (de colle et gène : qui engendre la cohésion) (Van der Rest et Garrone, 1991). Les molécules de collagène sont des macromolécules structurales de la matrice extracellulaire, sont des

glycoprotéines les plus abondantes dans l'organisme des animaux, qui ont une caractéristique de conformation en triple hélice (Van der Rest et Garrone, 1991).

Le collagène est le constituant majeur des structures des tissus, os, tendons, peau, ligaments, cartilage, vaisseaux sanguins et tissu conjonctif. Il fournit la solidité et il confère la forme tout en permettant la flexibilité et le mouvement (Cowin, 2000).

I.2.1.2. Les familles et types du collagènes

Le nom « collagène » est en fait utilisé comme terme générique pour les protéines formant une triple hélice caractéristique de trois chaînes α ; tous les membres de la famille des collagènes forment des structures supramoléculaires (Van der Rest et Bruckner, 1993; Van der Rest et Garonne, 1992; Kadler et Baldock, 2007)

D'après Gobeaux (2007), 28 types de collagènes ont été identifiés et classés dans sept familles différentes suivant leur structure et leur organisation supramoléculaire (Tableau 1). Les différents types de collagènes sont caractérisés par la complexité et la variété de leur structure, et la présence de domaines non hélicoïdaux additionnels (Gobeaux, 2007). Les types de collagène ont été marqués par des chiffres romains dans l'ordre de leur découverte. Ils peuvent être groupés selon leurs différences structurales (Shalaw, 2006).

Parmi les famille de collagène les plus abondant : la famille de collagène fibrillaire (type I,II,III,V) :la molécule complète contient seulement une triple hélice qui occupe presque toute la longueur de la molécule (El Bikai, 2010); la famille FACIT (Fibril Associated *Collagen* with Interrupted Triple helixes) (IX, XIV ,XII) :leur structure, en triple hélice interrompue, plusieurs ségment en triple hélice sont séparés par des domaines non hélicoïdaux (Vigier, 2008); la famille des collagènes formant des réseaux : leurs rôles dans la constitution des membranes basales essentielles en tant que support des épithéliums , le collagène IV est le majoritaire (Gelse et *al.*, 2003); et la famille des collagènes formant des filaments perlés :sont retrouvés dans un grand nombre de tissus où ils forment des liens structuraux avec les cellules (Vigier, 2008).

Tableau I : la famille et types du collagènes (Vigier, 2008 ; Lablack, 2011).

Famille	Type	Gènes	Distribution dans les tissus
Collagène fibrillaire	I	COL1A1 COL1A2	Os, derme, tendons, ligament, corné, derme, dentine
	II	COL2A1	Cartilage, humeur vitrée , nucleus pulposus
	III	COL3A1	

	V XI XXIV XXVII	COL5A1 COL5A2 COL5A3 COL11A1 COL11A2 COL2A1 COL24A1 COL27A1	Derme, paroi des vaisseaux, intestin Poumons, cornée, os Cartilage, cors vitré
Collagène formant des réseaux	IV VIII X	COL4A1 COL4A2 COL4A3 COL4A4 COL4A5 COL4A6 COL8A1 COL8A2 COL10A1	Membrane basale Vaisseaux (endothélium), cornée Cartilage, plaque de croissance
FACIT	IX XII XIV XVI XIX XX XXI XXII	COL9A1 COL9A2 COL12A1 COL14A1 COL16A1 COL19A1 COL20A1 COL21A1 COL22A1	Cartilage Tendons, ligaments Peaux, tendons
Collagène formant des filaments perlés	VI XXVI XXVIII	COL6A1 COL6A2 COL6A3 COL26A1 COL25A1	Derme, cartilage, placenta, pou, les vaisseaux
Collagène d' ancrage aux épithéliums	VII	COL7A1	Peau, jonction, dermo-épidermique, muqueuse orale, cervix, membrane foétale
Collagène transmembranaires	XIII XVII XXIII XXV	COL13A1 COL17A1 COL23A1 COL25A1	Cœur, vaisseaux
Collagène partiellement identifiés	XV XVIII	COL15A1 COL18A1	Rétine, iris

I.2.1.3. Structure du collagène

L'appartenance d'une protéine à la famille des collagènes se fait par la présence d'un motif d'acides aminés spécifique et d'un domaine en triple hélice dans sa structure tertiaire. (Strupler, 2008). La triple hélice peut être homotypique, c'est-à-dire formée par l'assemblage de trois chaînes α identiques, ou hétérotypique, résultant de l'association de au moins deux chaînes α différentes (Vigier, 2008).

La séquence primaire des molécules de collagène présente le motif répété Gly-X-Y, est insérée tous les 3 acides aminés (Strupler, 2008). Dans la composition du collagène, 3 acides aminés prennent une part assez importante : Gly c'est toujours une glycine pour 35%, la position X on retrouve le plus souvent une proline pour 7 à 9%, et la position Y une hydroxyproline pour 12 à 14% (selon le type de collagène) (Ludovic, 2008 ;Strupler, 2008).

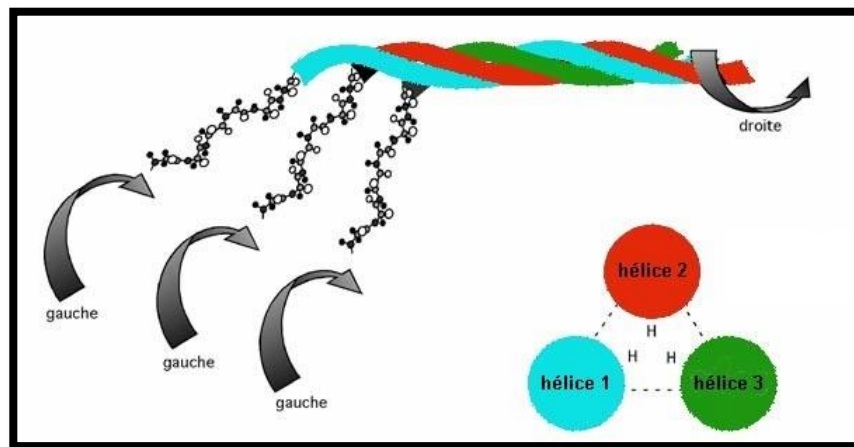


Figure 1 : structure du collagène.

La longueur d'une molécule de collagène est de 300 nm et de diamètre de 1,2 nm, sa masse moléculaire est comprise entre 285 000 et 300 000 daltons, très nombreuses liaisons chimiques (hydrogène, covalente et électrostatique) qui permettent de stabiliser l'ensemble de la structure en triple hélice de la molécule de collagène (Yan, 2012).

I.2.2. Origine du collagène

Le collagène est présent dans les os d'origine bovine ou porcine (Hinterwaldner, 1977 ; Ward et Courts, 1977).

L'épidémie de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB) maladie de la vache folle en 1980, a poussé à chercher de nouvelles sources alternatives de collagène provenant de poulet (Edward et *al.*, 1996), ou de l'environnement aquatique (Senaratne et *al.*, 2006) telles que les poissons, les méduses, les spongiaires, les calamars et d'autres fruits de mer (Zhang et *al.*, 2007).

I.2.3. Rôle du collagène

Le rôle du collagène est essentiel au maintien de l'intégrité des organes (Grinnell, 1994 ; Tomasek, 2002). Il confère aux tissus conjonctifs leur forme, leur résistance mécanique et leur flexibilité et joue aussi un rôle primordial dans l'œil, puisqu'il contribue aux propriétés

optiques de la sclera et de la cornée, respectivement l'opacité et la transparence (Gobeaux, 2007).

Lors du vieillissement, la diminution du collagène induit une modification de la rigidité, la souplesse et la densité des os en les rendant plus fragiles et aussi affaiblit la région où les tendons sont attachés à l'os, ce qui crée une zone plus fragile et cause souvent plusieurs blessures (Robillard, 2013).

I.2.4. Utilisation du collagène

Le collagène a été utilisé dans de nombreuses applications, les secteurs les plus utilisant sont : les industries biomédicales, pharmaceutiques et cosmétique. Il est également utilisé dans d'autres secteurs tels que l'industrie alimentaires (Kim et Mendis, 2006 ; Senaratne et *al*, 2006).

Le collagène peut servir à la production des fils chirurgicaux, la production des greffes sous cutanées, des capsules, il possède également des propriétés intéressantes dans le traitement de l'arthrite, afin de soulager les douleurs des patients atteints d'arthrite osseuse (Kim et Mendis, 2006). Il est largement utilisé dans les produits cosmétiques comme des crèmes pour le traitement des brûlures, des vergetures, des cicatrices et comme antirides pour le retardement des symptômes de vieillissement de la peau (Lablack, 2011).

Dans le secteur alimentaire, le collagène trouve des applications comme la préparation de gélatine et l'épuration des jus (Caroline, 2005).

II.1. le collagène type II

II.1.1. Définition du collagène type II

Le collagène type II (CII) est un composant principal de la matrice extracellulaire du cartilage, il constitue 90 à 95% de la teneur totale en protéines dans le cartilage (Poole et *al.*, 2005). Ce collagène fibrillaire fournit au cartilage sa résistance à la traction (Aubert-Foucher et *al.*, 2014). Il est aussi un composant de l'humeur vitreuse de l'œil (Edward et *al.*, 1996). Le CII est composé de trois chaînes α identiques (triple hélice) $[\alpha 1 (\text{II})]_3$ (Cao et *al.*, 2013).

Le domaine principal de triple hélice est constitué de 1014 résidus d'une séquence Gly-X-Y- (Gly est toujours une glycine, et dans la position X retrouve le plus souvent une proline et à la position Y une hydroxyproline) répétée (Hans Peter et *al.*, 2010). La molécule de collagène II est synthétisée par un seul type de cellules de cartilage c'est les chondrocytes (Aubert-Foucher et *al.*, 2014) et codées par le même gène *col2A1*.

II.1.2. Synthèse du collagène type II

Les gènes codant par le collagène possèdent un nombre variable d'exons (entre 3 et 17) séparés par des introns. Pour un gène donné, des sites différents d'initiation de la transcription ou bien des épissages alternatifs des introns peuvent donner naissance à différents types de collagènes. Un gène est donc associé à plusieurs chaînes α ; une fois synthétisés au niveau des ribosomes, les chaînes α sont sécrétées dans la lumière du réticulum endoplasmique où elles vont subir d'importantes modifications post traductionnelles, certains résidus prolines et lysines vont être hydrolysées, et certaines hydroxy-lysines glycolysées. Enfin, la formation des ponts disulfures entre les propeptides C-terminaux va aligner trois chaînes α qui vont s'enrouler comme une fermeture éclair en direction du N-terminaux (Hulmes, 2002).

Les triples hélices de collagènes, appelées à ce stade procollagène, sont alors empaquetées dans des vésicules dans l'appareil de Golgi et excrétées à l'extérieur de la cellule.

Après exocytose, par l'action d'une enzyme, la procollagène peptidase, les extrémités N- et C- terminales (propeptides) sont clivées pour former la molécule de collagène (Yan, 2012), la molécule est alors dénommée tropocollagène. La diminution de la solubilité liée à la perte des peptides terminaux enclenche le phénomène de fibrillogenèse. Les molécules de tropocollagènes (300 nm de long et 1,5 nm de diamètre) vont s'aligner parallèlement et dans le même sens, mais avec un décalage de 67 nm.

Pour stabiliser l'ensemble, des lysines de la partie N-terminale d'une molécule sont pontées de façon covalente à d'autres lysines de la partie C-terminale d'une molécule voisine par l'action de la Lysyl oxydase. Cela permet aux molécules de tropocollagène de s'assembler

en une fibrille de diamètre variable, entre quelques dizaines de nanomètres et des centaines de nanomètres, suivant les organes et leur composition dans les différents types de collagène (Strupler, 2008) sont stabilisés par la formation de liaisons covalentes induites par une autre enzyme spécifique, la lysyl oxydase (Yan, 2012)

Les fibrilles elles-mêmes peuvent se regrouper en fibre de collagène dont le diamètre est compris entre 1 μm et 10 μm (Strupler, 2008).

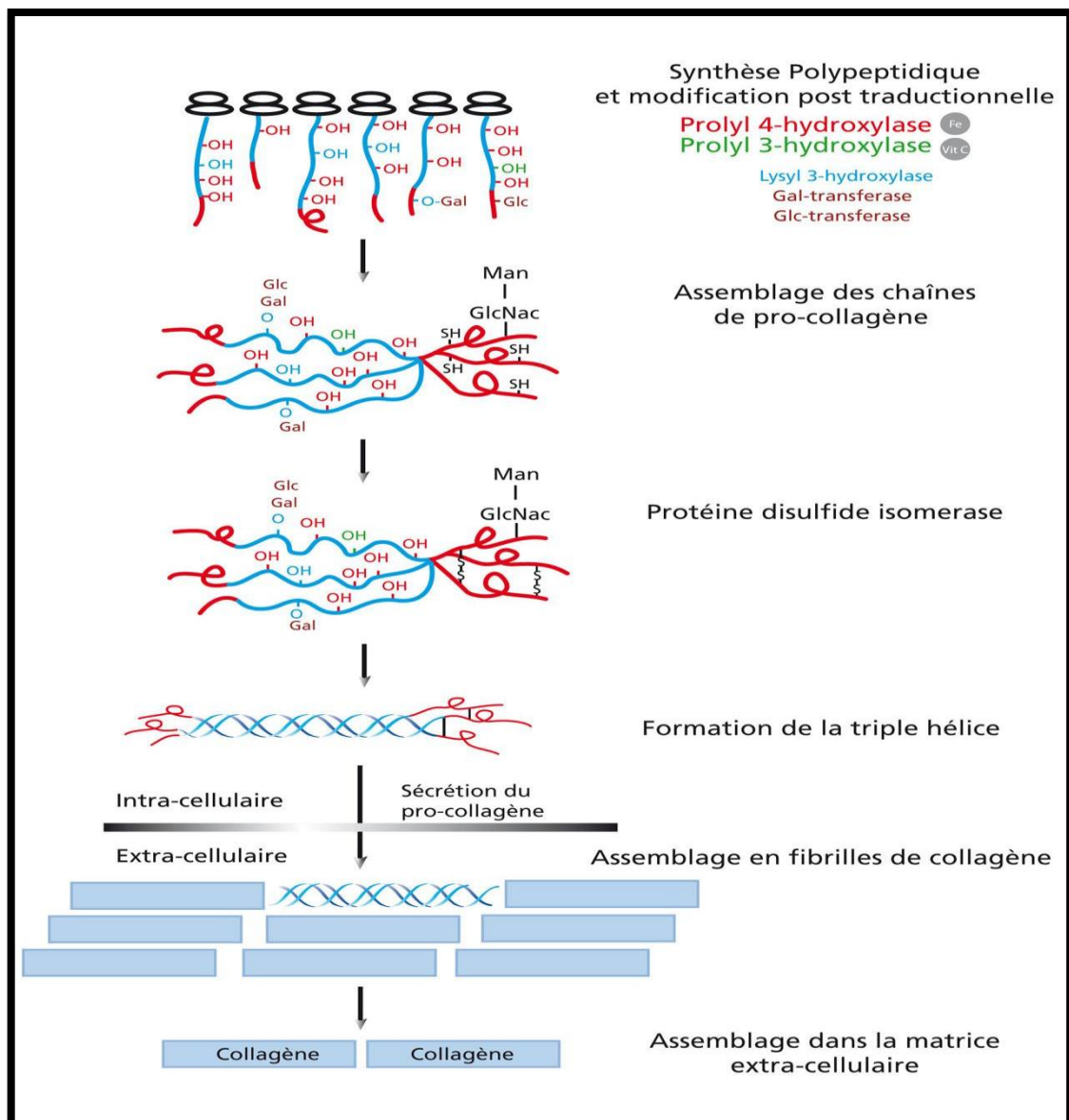


Figure 2 : Synthèse de collagène II

II.1.3. Origine du collagène de type II

La plupart des Collagène II commerciaux sont obtenus à partir de cartilage articulaire des mammifères (bovine ou porcine) (Drugs, 2014). Le CII est aussi isolé à partir d'animaux marins : concombre de mer (Zhong *et al.*, 2007 ; Zhu, 2012), méduses (Zhuang *et al.*, 2009).

Le cartilage de sternal de volaille est utilisé pour produire le CII en raison de leur abondance et leur faible coût (Cao *et al.*, 2013).

II.1.4. Utilisation du collagène type II

Le collagène II avec sa structure moléculaire spécifique a été largement utilisé dans les produits alimentaires, pharmaceutiques, cosmétiques et dans les industries en raison de son excellente biocompatibilité et la biodégradabilité (Cao *et al.*, 2013).

II.1.4.1. Utilisation biomédicales et pharmaceutiques

Plusieurs chercheurs ont prouvé que les effets de l'administration orale de collagène type II ont été évalué pour le traitement de l'arthrite (Zhao *et al.*, 2011 ; Garcia *et al.*, 1999), et aussi a une action sur la suppression de Rhumatisme Articulaire (David et Roselyn., 1993 ; Trentham *et al.*, 1993).

Son utilisation s'étend encore dans les applications pharmaceutiques (dans la technologie de tissus pour des implants chez l'homme, l'enrobage des comprimés) (Cao et Shi-Ying, 2007).

II.1.4.2. Utilisation dans les produits alimentaires

Le collagène de type II est utilisé dans diverses applications alimentaires (agent de clarification, émulsifiant ou agent moussant) (Cao et Shi-Ying, 2007).

II.1.4.3. Utilisation dans les produits cosmétiques

Son utilisation se prolonge aussi dans l'industrie cosmétique (shampooing et rouge à lèvres) (Cao et Shi-Ying, 2007).

II.1.4.4. Utilisation dans la provocation de l'arthrite:

Le CII émulsifié avec ACF (adjuvant complet de Freund) et AIF (adjuvant incomplet de Freund) induit une inflammation chronique chez les rats et les souris semblable à l'arthrite rhumatoïde chez l'être humain (Jung *et al.*, 2012).

II.2. La polyarthrite rhumatoïde

D'après Klareskog *et al.*, (2006) le terme « arthrite » désigne toutes les affections inflammatoires qui touchent les articulations de manière aiguë ou chronique.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la plus fréquente des maladies auto-immunes et des rhumatismes inflammatoires chroniques humaines. Elle affecte entre 0,3 % et 1 % de la population générale, préférentiellement les femmes (Musset et Ghillani., 2013). Elle se manifeste par une inflammation chronique de la membrane qui entoure les articulations, la membrane synoviale (Klareskog et *al.*, 2006). La membrane enflammée forme alors un pannus qui recouvre et s'attaque au cartilage, aux ligaments, aux muscles et à l'os, provoquant à la longue une déformation des articulations pouvant devenir invalidante (Klareskog et *al.*, 2006). La PR est également une maladie systémique pouvant s'accompagner de manifestations extra-articulaires (cardiaques, pulmonaires, vasculaires, nerveuses, oculaires) (Musset et Ghillani., 2013).

II.2.1. L'origine de la polyarthrite rhumatoïde

L'origine de la polyarthrite rhumatoïde n'est pas parfaitement connue mais, elle est due à un ensemble des facteurs qui ne sont pas toujours présents, tels que des facteurs génétiques, immunologiques, hormonaux, d'environnement et des facteurs psychologiques (Combe, 2006).

II.2.2. Les manifestations immunologiques

Les manifestations immunologiques de la PR sont nombreuses: une infiltration d'un grand nombre de lymphocytes T, principalement CD4+, à des stades variés d'activation est observée et est habituellement associée à des cellules dendritiques et à des macrophages. Des amas de plasmocytes sont souvent présents, et la synoviale est devenue un ganglion lymphatique actif. De nombreuses cytokines sont sécrétées dont l'IL-1 et le TNF α .

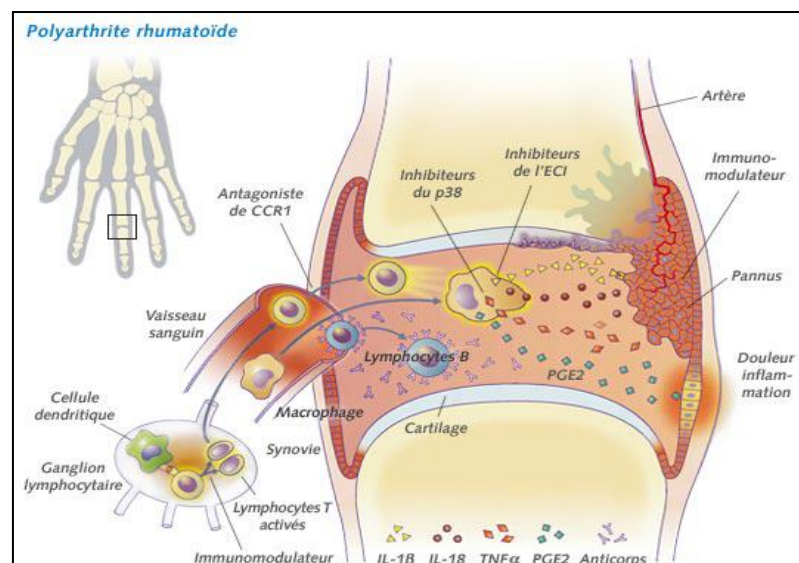


Figure 3: Réaction inflammatoire de polyarthrite rhumatoïde

D'autres cellules telles que le lymphocyte B, qui ont une double fonction :

- D'une part : entraînant la production d'auto-anticorps (anticorps dirigés contre des constituants du soi), deux sont particulièrement caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde: le facteur rhumatoïde qui est une immunoglobuline (protéine) dirigée contre une autre immunoglobuline et les anticorps anti-CCP (anticorps dirigés contre des protéines citrullinées) qui sont les plus spécifiques de la maladie. Ces auto-anticorps ont un rôle dans les mécanismes pathogéniques de la maladie mais sont également très utiles pour le diagnostic et pour formuler un pronostic (Combe, 2006).

- D'autre part : produire des substances solubles appelées notamment les cytokines. Celles-ci vont favoriser les interactions entre les cellules, mais également favoriser la production de nombreux médiateurs solubles responsables de la réaction inflammatoire et de la destruction du cartilage et de l'os. Ces cytokines vont notamment agir au niveau de l'articulation, sur les cellules de la synoviale (synoviocytes) qui vont pouvoir proliférer et entraîner la synovite rhumatoïde (véritable tumeur dans l'articulation). Ces cytokines vont activer également les cellules du cartilage (chondrocytes) et les cellules de l'os (ostéoclastes), entraînant ainsi des lésions articulaires caractéristiques de la polyarthrite rhumatoïde(Combe, 2006).

II.2.3. Les signes cliniques de la Polyarthrite rhumatoïde

La PR débute en général de manière insidieuse par l'inflammation d'articulations isolées, la lésion initiale est une inflammation de cette synoviale, à l'origine des douleurs, de gonflements, d'un épanchement articulaire, d'une chaleur et d'une mobilité réduite. Le liquide synovial en excès contient des enzymes qui attaquent le cartilage, les os et d'autres structures de l'articulation atteinte, les détruisant progressivement (Adrian, 2011).

Avec le temps, l'inflammation se propage à de nombreuses autres articulations, petites ou grandes. Les plus fréquemment touchées sont celles des mains et des doigts (Adrian, 2011).

II.2.4. Le traitement médicamenteux de la PR

Le traitement médicamenteux de la PR comporte d'une part des thérapeutiques à visée symptomatique (antalgiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens, corticoïdes), d'autre part des traitements dits de fond (Combe B et René-Marc, 2008) et un traitement biologique appelé « biothérapies (Hayder., 2011). L'objectif du traitement médicamenteux est non seulement d'atténuer la douleur, mais aussi de prévenir les dommages aux articulations (Adrian., 2011).

II.2.4.1. Traitements symptomatiques

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) : les AINS utilisés dans la PR sont nombreux, ils sont très utiles du fait de leur effet à la fois anti inflammatoire et antalgique (Bernard et René-Mar., 2008) exp : Brufen, Voltarène et Celebrex (Adrian, 2011). L'efficacité limitée de ces traitements et leur incapacité à modifier le cours de maladie à long terme a conduit à l'utilisation de traitements, dits de fond (Hayder, 2011).

II.2.4.2. Les traitements du fond

Visant à contrôler les manifestations inflammatoires cliniques de la maladie et à freiner son évolution destructrice, l'efficacité de ces traitements, est en général retardée (un à trois mois), rémanente (reprise d'activité après l'arrêt du traitement), (Hayder, 2011). Ils réduisent le gonflement articulaire et la douleur, inhibent les marqueurs de la phase aiguë de la maladie et limite la destruction osseuse (Hayder, 2011) et parmi ces traitements, il se retrouve : le Méthotrexate qui inhibe la synthèse de l'ADN (Hayder, 2011).

II.2.4.3. La biothérapie

La biothérapie est basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ou de protéines de fusion ciblant une cytokine particulière (blocage du TNF- α) ou une molécule de surface spécifique. Plusieurs anti-TNF- α ont été développés et sont couramment utilisés en clinique (Infliximab, Adalimumab, Etanercept) (Hayder, 2011)

Bien que les traitements médicamenteux soient efficaces et assez bien tolérés, un nombre conséquent de patients ne répondent pas à ces traitements. De plus, les effets secondaires qui découlent de leur utilisation, notamment à forte dose, sont assez conséquents, ceci a conduit au développement de la médecine alternative qui comporte la phytothérapie.

II.2.5. Traitement de la polyarthrite rhumatoïde par les plantes médicinales

Les interventions de phytothérapie désignent toute préparation à base de plantes (entière, en poudre, en extrait, mélange standardisé) utilisée à des fins médicales. Depuis longtemps de nombreux traitements à base de plantes ont été employés pour traiter la PR. De nombreuses plantes semblent agir en bloquant l'activité des cellules et substances immunitaires et en réduisant l'inflammation au niveau des articulations ; certaines personnes estiment que les effets secondaires sont moins nombreux (cochrane.org).

Les plantes médicinales suivantes ont su montrer une efficacité pour aider à soigner la polyarthrite rhumatoïde.

II.2.5.1. Griffe du diable ou harpagophyton

Plante médicinale anti-inflammatoire (surtout au niveau du cartilage), antiphlogistique, analgésique. Utilisée lors de rhumatismes comme l'arthrose (le point.fr)



II.2.5.2. Saule

Plante médicinale indiquée en cas de refroidissement ou lors de douleurs rhumatismales à cause de son effet antidouleur et anti-inflammatoire (creapharma.fr).



II.2.5.3. Poivre de Cayenne Piment

Plante médicinale hyperémiant utilisée en usage externe lors d'affections rhumatismales (creapharma.fr).



Notre choix s'est porté sur le Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* qui est une source très riche en tanins et flavonoïdes que l'on rencontre dans les feuilles. Elle est largement utilisée dans le bassin méditerranéen pour ses nombreuses vertus thérapeutiques (Boutlelis, 2014).

II.2.6. Marrubium vulgare

II.2.6.1. Systématique de la plante

Le Marrube vulgare est une plante, d'aspect blanchâtre très rameux, à poils laineux appliqués, a feuilles petites en coin à la base et portant quelque dents au sommet, fleurs en petites glomérules à l'aisselle des paires de feuilles, corolle petite par rapport au calice tubuleux, celui-ci s'accroissant considérablement par sa partie supérieure en formant autour du fruit une auréole membraneuse (Ozenda, 2004).



Figure 4 : Espèce *Marrubium vulgare*

Selon Judd et *al.*, (2002) la position systématique de l'espèce *Marrubium vulgare* est :

Embranchement	Angiosperme
Classe	Eudicotylédones
Sous-classe	Gamopétale
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacées
Genre	Marrubium
Espèce	Vulgar

II.2.6.2. Utilisation traditionnelle de la Marrubie:

La plante de Marrubie a plusieurs utilisations traditionnelles telles que: le traitement de la perte d'appétit, traitement de toux, elle est employée contre le diabète, les infections des voies respiratoires et les troubles de la sécrétion biliaire, les affections bronchiques aiguës bénignes et les rhumes (Boutlelis, 2014).

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériels

III.1.1. la matière première

III.1.1.1. Le cartilage de poulet

L'étude a été effectuée sur le sternale cartilage de poulet qui a été obtenu a partir des boucheries de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, puis congelé jusqu'à son utilisation.



Figure 5 : Cartilage de poulet.

III.1.1.2. La plante

La plante Marrubie a été récoltée le mois d'avril de la région de Bordj Bou Arreridj.



Figure 6: le Marrube blanc

III.1.2. Les animaux

Notre étude a été réalisée sur 15 rats Albinos femelle de souche Wistar, du poids $221\text{g} \pm 23.88$. Ces animaux ont été procurés auprès de l'Institut Pasteur d'Alger (kouba). Les animaux ont bénéficiés d'une période d'adaptation de 1mois avant leur utilisation dans l'animalerie du département des sciences de la nature et de la vie université de Bordj Bou Arreridj. Les animaux ont été logés dans des cages avec accès libre à l'alimentation (croquette provenant de la société de production des aliments d'animaux, Groupe Avicode El-Kseur Bejaia) et l'eau, sont mis dans des conditions standards à une température de $20^{\circ}\text{C} \pm 2$, avec un cycle lumière /obscurité 12/12.



Figure 7 : Les rats Albinos Wistar

III.1.3. Les produits et les réactifs

- Adjuvant complet de Freund's qui contient *Mycobacterium tuberculosis* tuée par la chaleur, et adjuvant incomplet de Freund's, Pepsine, Bleu Brilliant de Coomassie, BSA, acide acétique, les boudins de dialyse ces produits proviennent de Sigma (Allemagne).
- Isopropyle alcool, Acide formique, EDTA (Biochem Chemopharma).
- Tris (CHIM-OZA)

III.2. Méthodes

III.2.1. La purification du collagène type II

La purification du collagène est effectuée selon la méthode de Edward et *al.*,(1996) avec quelque modifications, elle contient plusieurs étapes

III.2.1.1. La première étape

Après la récolte de cartilage à partir des boucheries de la wilaya de Bordj Bou Arreridj, le cartilage a été congelé jusqu'à son utilisation.

100 g de cartilage a été rincé par l'eau distillée, puis le cartilage a été lavé une deuxième 2 fois par l'isopropyle l'alcool (70%) pour le désinfecter. Un scalpel est utilisé pour la dissection et l'excision des impuretés. Puis l'isopropyle a été éliminé par l'eau distillée. Le cartilage est identifiable comme, un tissu ferme, élastique et translucide qui est facilement découpé en tranches. Les tissus non cartilagineux sont durs, blancs, non élastiques, et plus difficiles à couper. Après la désinfection, le cartilage est mis dans une solution de Tris Hcl de 50mM contenant 1M de NaCl, et on a incubé durant une nuit à 4°C.

Après 12h, le périchondre a été éliminé (le périchondre est potentiellement riche en collagène type I), le périchondre restant est facilement enlevé du sternum à la main.

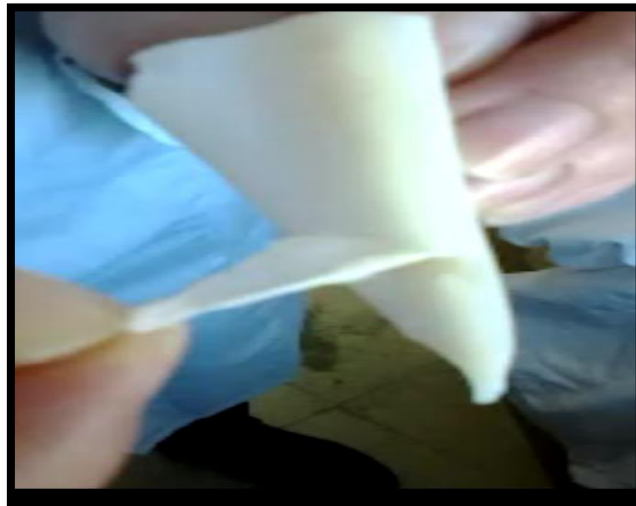


Figure 8 : Le périchondre

III.2.1.2. La deuxième étape

Après que le périchondre a été enlevé, le cartilage a été rincé par l'eau distillée pour éliminer tous les impuretés. A l'aide d'un scalpel le cartilage est coupé en morceaux de 5 mm pour faciliter le broyage, ensuite ces morceaux ont été hachés par un mélangeur de nourriture en ajoutant des morceaux de glaces pour garder la température inférieure à 4°C. L'excès en eau a été éliminé par la centrifugation dans des flacons en plastique de 50ml de centrifugeuse (SIGMA 2-6E) pendant 30 minutes à 3900 rpm, à 4°C.

Le cartilage hacher a été mis avec 1L de Tris-HCl (NaCl 1M) par 100 gramme de cartilage haché pendant une nuit à 4°C. Le but de cette étape est l'élimination du protéoglycane par centrifugation à 3900 rpm pendant 20 minute. L'opération a été répétée 3 fois on ajoutant 10 à 15 ml d'eau distillée par gramme de cartilage haché.



Figure 9 :le cartilage rassemblé

III.2.1.3. La troisième étape

La digestion du cartilage est effectuée par la pepsine dans l'acide acétique 0.5M de pH 2.8, la solution a été agitée pendant 48h à 4°C.

III.2.1.4. La quatrième étape

Le collagène II soluble a été séparé du résidu de cartilage par une centrifugation dans des flacons à 3900 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant contient le collagène II soluble et le culot qui possède des résidus non solubles qui ont été éliminés.

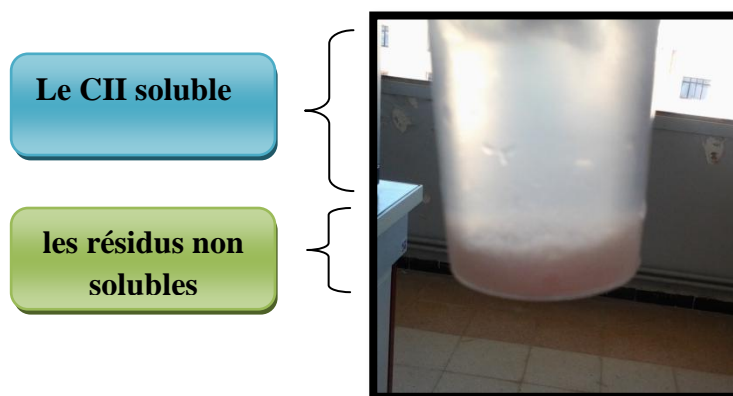


Figure 10 :le CII soluble et les résidus non solubles

III.2.1.5. La cinquième étape

Le surnageant qui a été obtenu dans l'étape précédente a été mélangé avec 5M de NaCl (qui a été ajouté goutte à goutte au surnageant sur une période de 30 à 45 minutes pour obtenir une concentration finale de 0.8 M) permettant au collagène de précipiter pendant 24 heures à 4°C. Après 24h, une centrifugation a été faite dans des flacons de 50 ml à 3900 rpm pendant 20 minutes, pour éliminer les impuretés qui restent dans la solution, puis le précipité est récupéré et le NaCl et l'eau ont été éliminés.

Le précipité obtenu a été dissout dans 100 mM d'acide acétique en agitant durant une nuit à 4°C. La solution obtenue a été centrifugée pendant 20 minutes à 3900 rpm, pour enlever n'importe quelle matière insoluble, puis le surnageant a été récupéré. Le collagène obtenu a été solubilisé dans 200 ml d'acide acétique de 0.1M pendant une nuit à 4°C.

III.2.1.6. La sixième étape

La dialyse correspond à une diffusion passive des molécules à travers une membrane de dialyse. Cette dernière peut être assimilée à une surface percée de pores de tailles régulières. Elle se comporte vis à vis des solutés comme un tamis moléculaire : les molécules de taille inférieure aux pores passent à travers la membrane alors que les molécules de taille supérieure aux pores sont bloquées par la membrane.

Les boudins ont été remplis par la solution du collagène II, ont été immergés dans une solution hypotonique contient 10mM de Na_2HPO_4 , durant une nuit à 4°C. Chaque 24 heures il faut changer la solution de Na_2HPO_4 .



Figure 11 : les boudins de dialyse

Les boudins ont été vidés dans un récipient et ont été rincés par l'acide acétique pour enlever le collagène II restant dans les parois; ensuite le collagène a été lavé de toute molécule restant en ajoutant 200ml de Na_2HPO_4 au récipient. La solution a été centrifugée, le culot a été récupéré et le surnageant a été jeté. Ensuite le culot est solubilisé dans 100mM de l'acide acétique (pour récupérer le collagène et éliminer toutes matières insolubles).

La solution de collagène a été centrifugée, puis le culot a été éliminé et le surnageant a été préservé.

La dialyse est refaite une deuxième fois contre l'acide acétique 0.1M. Les boudins de dialyse ont été vidés dans un flacon, puis les boudins ont été rincés avec l'acide acétique pour récupérer le reste du collagène.

La solution de collagène a été concentrée en utilisant un polymère (polyéthylène glycol) qui adsorbe les molécules d'eau.



Figure 12 : le collagène final

III.2.2. Analyse du collagène

III.2.2.1. Le spectre d'absorbance en UV-Visible

Le collagène obtenu a été analysé par le spectrophotomètre UV-Visible pour déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale (λ max), ainsi que la présence ou l'absence des impuretés dans la solution du collagène type II.

III.2.2.2. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques. Le choix dépend des besoins et des caractéristiques recherchées: fiabilité, sensibilité, rapidité, taille des échantillons, possibilité de récupérer l'échantillon après dosage, présence de substances

Interférentes dans l'échantillon. Nous avons choisi la méthode de Bradford pour le dosage des protéines.

III.2.2.2.1. Principe

Bradford et al,(1976) ont développés une méthodes basée sur l'absorbance du colorant bleu brillant de Coomassie (CBB) G-250,c'est une méthode colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance(la mesure se faite a 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur de CBB après liaison avec les acide aminés basique(arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. La forme anionique (liée) du colorant est bleue et possède un spectre d'absorption maximale estimé historiquement à 595 nm. La forme cationique (libres) du colorant sont rouges et marron, absorbance à 465-470 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines dans l'échantillon.

III.2.2.2.2. La Préparation d'une gamme d'étalonnage

4mg de BSA (protéine standard) a été dissoudre dans 4ml d'eau distillée soit une solution mère avec une concentration 1mg /1ml.

A partir de cette solution, on a préparé 5 solutions étalons filles de concentration de 0.3 à 1mg/ml. Le volume total (BSA+ tampon) doit être 100 μ L dans tous les tubes. 100 μ L de l'échantillon sont mis en présence 5 ml de réactif de Bradford, et aussi 0.1ml du collagène + 5ml de bleu de coomassie.

Chaque concentration de la gamme d'étalonnage et de l'échantillon sont mis en triplicata, l'absorbance a été mesurée à 595 nm contre le blanc .

Tableau II : gamme d'étalonnage

	1	2	3	4	5
BSA	30	40	60	90	100
Eau distiller	70	60	40	10	0
Concentration mg/ml	0.3	0.4	0.6	0.9	1

III.2.2.3.La détermination de la pureté du collagène par l'électrophorèse SDS-PAGE

Electrophorèse SDS-PAGE repose comme toutes techniques électrophorétique, sur la séparation des molécules chargées dans un champ électrique. Une cuve à électrophorèse est reliée à deux bornes une cathode (-) et une anode (+) alimentées par un générateur électrique : les molécules que l'on intercale dans ce champ migreront, selon leur charge, vers le pôle complémentaire.

La particularité de la SDS-PAGE est de soumettre les échantillons protéiques à un prétraitement dénaturant. Les protéines sont soumises à l'action de deux composés, le β mercaptoéthanol est le composé qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle, et le SDS c'est un composé capable de venir se fixer sur la périphérie des chaînes de protéines tout en leur conférant une charge négative. Les protéines recouvertes par le SDS auront donc toute une charge négative. Influencées ainsi par le SDS, elles migreront donc toutes vers l'anode (+), la charge réelle des protéines n'est donc plus mise en jeu et donc seule leur masse moléculaire influencera leur migration.

Le CII est analysé en SDS-PAGE. Le gel est préparé selon la méthode de laemmli (1970). Nous avons utilisé un gel de concentration 5% et un gel de séparation 7 %.

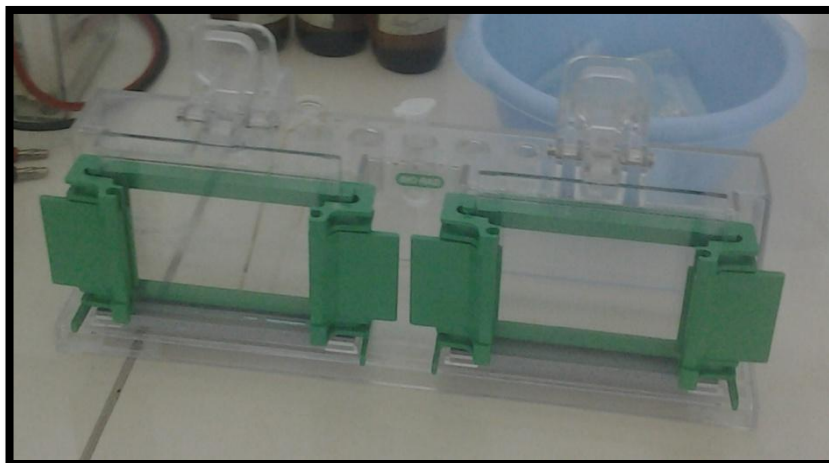


Figure 13: Electrophorèse (FISHER Scientific)

III.2.2.3.1. Préparation des gels

Les différentes compositions de gel d'électrophorèse sont représentées dans le Tableau 3

Tableau III: Composition de gel d'électrophorèse

Solutions mères	Gel de concentration 5%	Gel de séparation 7%
Solution d'acrylamide/bisacrylamide 30%	1.7 ml	2.38ml
Tampon tris-HCL	2,5 (pH 6,8)	2,5 (pH 8,8)
Eau distillée	5,7 ml	3,4 ml
SDS 10% (µl)	100	100
TEMED (µl)	10	15
persulfate d'ammonium 10%(µl)	100	100

Après le coulage du gel de séparation, un espace supérieur d'environ de 1 à 1.5 cm a été laissé pour mettre le gel de concentration. Une quantité (1-2 ml) de l'eau distillée a été ajoutée juste après, pour que le haut du gel soit horizontal, le gel de séparation ne s'oxyde pas et aussi pour que le gel de séparation se mélange facilement avec le gel de concentration. Après polymérisation du gel, l'eau a été débarrassée par le papier filtre, le gel de concentration a été coulé et un peigne a été mis pour former des puis dedans.

III.2.2.3.2. Solubilisation des échantillons et migration :

Préparation des échantillons : Les échantillons ont été préparés par le tampon d'échantillon (100 µl de chaque solution est mélangé à 100 µl de tampon d'échantillon) puis chauffés à 100 °C pendant 10 minutes. Les dépôts sont réalisés à l'aide d'une seringue Hamilton.

Tableau IV : Tampon d'échantillon

Tris-HCL (ph 6,8)	1,25 ml
Glycérol	2,5 ml
bleu de bromophenol 0,5%	0,2 g
SDS 10%	2 ml

III.2.2.3.3. La migration

Une pré-électrophorèse a été conduite 10 à 15 mA à température du laboratoire (1h). Après cette pré-électrophorèse, les échantillons ont été déposés avec des volumes de 15 µl /puits. La migration a été effectuée par le tampon d'électrophorèse, au début l'application d'un courant électrique de 10 mA jusqu'à la pénétration des protéines dans le gel de séparation l'ampérage a été ensuite augmenté jusqu'à 30 - 60 mA.

III.2.2.3.4. Coloration des gels

Une fois la migration achevée, le gel a été démoulé et coloré. Après au moins une heure de coloration, de compositions :

- bleu de Coomassie R 250 :1g
- d'acide acétique : 50 ml
- méthanol : 225
- d'eau distillée : 225 ml

III.2.2.3.5. Décoloration des gels :

Les gels sont ensuite décolorés jusqu'à parfaite transparence dans un mélange d'acide acétique (75ml) et l'eau (925ml)

III.2.3. L'activité arthritogène du collagène

Le CII peut provoquer une inflammation chronique chez le rat semblable à l'arthrite rhumatoïde chez l'homme.

Pour tester l'activité biologique (arthritogène) du CII qui a été purifié à partir de sternal cartilage de poulet, nous avons administré le collagène aux rats par voie intradermique.

Les rats ont été répartis en 2 groupes, groupes arthritique qui contient 10 rats, et un groupe témoin qui contient 5 rats.

L'arthrite a été induite chez les rats Albinos Wistar selon la méthode de Trentham et *al.*,(1977);Christina et *al.*,(2008), avec quelques modifications.

III.2.3.1. La provocation de l'arthrite

100 μ l de collagène type II de concentration 3 mg/ml a été émulsifié avec 100 μ l de ACF (adjuvant complet de Freund), le mélange a été administré par voie intradermique à la base de la queue et 4 points différentes du dos des rats.

Après 7 jours de la 1^{ère} immunisation 100 μ l de collagène II de concentration 2 mg/ml a été émulsifié avec 100 μ l de AICF (adjuvant incomplet de Freund) (Figure 9).



Figure 14: Administration intradermique

III.2.3.2. Evaluation des signes cliniques de l'arthrite

Les signes cliniques de l'arthrite, ainsi que leur sévérité sont évalués, selon un score d'échelle de 0-4 avec les critères suivants:

- 0: Aucune preuve de rougeur et / ou de gonflement.
- 1: Rougeur avec peu ou pas de gonflement de la patte.

- 2: Gonflement et/ou rougeur principalement jusqu'à le Métatarse.
- 3: Gonflement de l'ensemble de la patte et une rougeur des régions de la cheville.
- 4: Gonflement maximale de la patte et une rougeur impliquant la cheville, les régions du métatarse et du tarse.

Un rat qui a montré un score de 1 ou plus est considéré comme arthritique, le score arthritique de chaque rat est exprimé par la somme des scores partiels (score de chaque patte individuelle) avec un score maximum possible de 16.

III.2.3.2.1. Le poids corporel

Le poids des rats a été mesuré dès le 1^{er} jour de l'expérience (répartition des rats), jusqu'à la fin de l'étude, afin de déterminer la quantité de collagène, nécessaires à administrer aux animaux et de contrôler les changements de leurs poids Corporel.

III.2.3.2.2. Examen sanguin

Afin de déterminer les marqueurs sérique de l'inflammation des examens sanguin sont effectués.

III.2.3.2.2.1. Le prélèvement du sang

De nombreuses techniques de prélèvement sanguin sont décrites chez les rats. Le choix de la technique dépend des différents critères (Kraus et al., 1980). Après 21 jours de l'induction de l'arthrite le sang a été prélevé par des tubes capillaires à partir des sinus rétro-orbital après l'anesthésie avec l'éther (figure 10). Le sang est récupéré et recueillir dans des tubes EDTA (Acide éthylène diamine tétraacétique) pour l'analyse des paramètres hématologiques (VS, NGB) .



Figure 15 : Prélèvement du sang à partir de la veine de sinus rétro-orbital.

III.2.3.2.2.1.1. La vitesse de sédimentation des globules rouges

La détermination de la vitesse de sédimentation des globules rouges repose sur le principe du sang rendu incoagulable, les globules rouges sédimentent spontanément avec une certaine vitesse. La hauteur de la colonne de plasma au dessus de la couche de globules rouges mesurée en mm représente la vitesse de sédimentation (Philippe ., 2005) L'accroissement de la vitesse indique la présence de l'inflammation (Pebret, 2003).

La vitesse de sédimentation a été mesurée après 21 jours de l'induction de l'arthrite pour les rats arthritiques et les rats témoins, après que le sang a été introduit dans des tubes capillaires, ces tubes sont maintenus en position verticale. La VS est calculée après 1 h et confirmée après 2h, et les résultats sont exprimés en mm/h.

III.2.3.2.2.1.2. L'hémogramme FNS (La formule numération sanguine)

L'hémogramme, est une étude quantitative et qualitative des différents éléments cellulaires du sang :les globules blancs (ou leucocytes), les globules rouges (ou hématies) et les plaquettes sanguines. La numération formule sanguine est un test de dépistage et de diagnostic de nombreuses affections et maladies

Les échantillons du sang prélevé sont mis dans des tubes EDTA ensuite le dénombrement des Leucocytes a été mesuré par un automate (ABACUS 3).

III.2.4.Le traitement de l'arthrite par la plante Marrubie

III.2.4.1. Extraction de la plante Marrubie

L'extraction de la plante Marrubie a été réalisée selon la méthode de Markham (1982) avec quelque modification: la macération en utilisant l'éthanol, 50g de la plante a été mis dans le solvant (éthanol 50%) à température ambiante. Après 24 h les suspensions sont filtrées pour obtenir le filtrat Après récupération des filtrats, une évaporation sous vide est réalisée à 45 C°, en utilisant un rotavapor (BUSHI R-215) pour obtenir l'extrait brut de Marrubie (figure11), puis cet extrait est mis dans l'étuve(Memmert) à 45C° jusqu'à l'obtention d'une poudre, ensuite l'extrait a été conservé au réfrigérateur jusqu'à son utilisation.

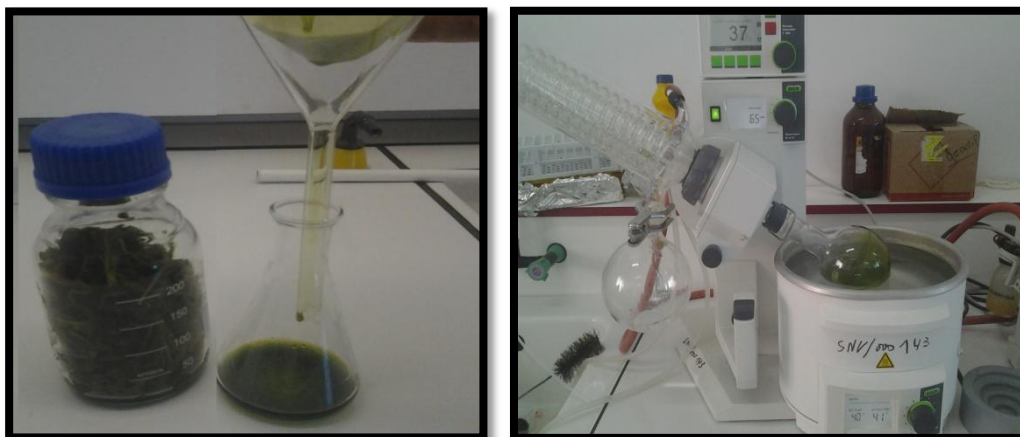


Figure 16: Filtration et Evaporation de Marrubie

III.2.4.2. Administration de l'extrait de Marrubie :

A partir de l'extrait de Marrubie, on a préparé avec l'eau physiologique des doses de 150mg de l'extrait de la plante Marrubie/kg du poids corporelle des rats. Les rats arthritiques sont divisés en 2 groupes :

Un groupe traité : les rats ont reçu par gavage 1ml de cette solution de dose 150mg/kg chaque jours jusqu'à la fin de traitement (9 jours), et le 2^{ème} groupe considéré comme temoin (+)

III.2.4.3. Prélèvement du sang

A la fin de l'étude, les échantillons du sang ont été prélevés à l'aide des tubes capillaires. Le sang a été récupéré et recueillir dans des tubes EDTA pour l'analyse des paramètres hématologiques (Nombre des GB).

IV. Résultats

IV.1. Rendement

Selon le procédé de Reddy et d'Enwemeka (1996), le rendement (%) du collagène type II a été déterminé par la formule suivante : $[\text{le poids du collagène type II}(0.217\text{g})/\text{le poids du cartilage de poulet (60g)}] \times 100$. Le rendement de collagène type II obtenu à partir de sternal cartilage de poulet est de 0,36%.

IV.2. La pureté

La pureté de collagène est évaluée par deux paramètres :

- ❖ L'absorbance en UV
- ❖ Le degré de la pureté de collagène II par SDS- PAGE

IV.2.1. Le spectre d'absorbance en UV

Le spectre d'absorbance en UV de l'échantillon de collagène type II a été mesuré en utilisant le spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1800) sur une longueur d'onde entre 190-400 nm, le spectre de balayage de collagène II obtenu est représenté dans la figure 17 :

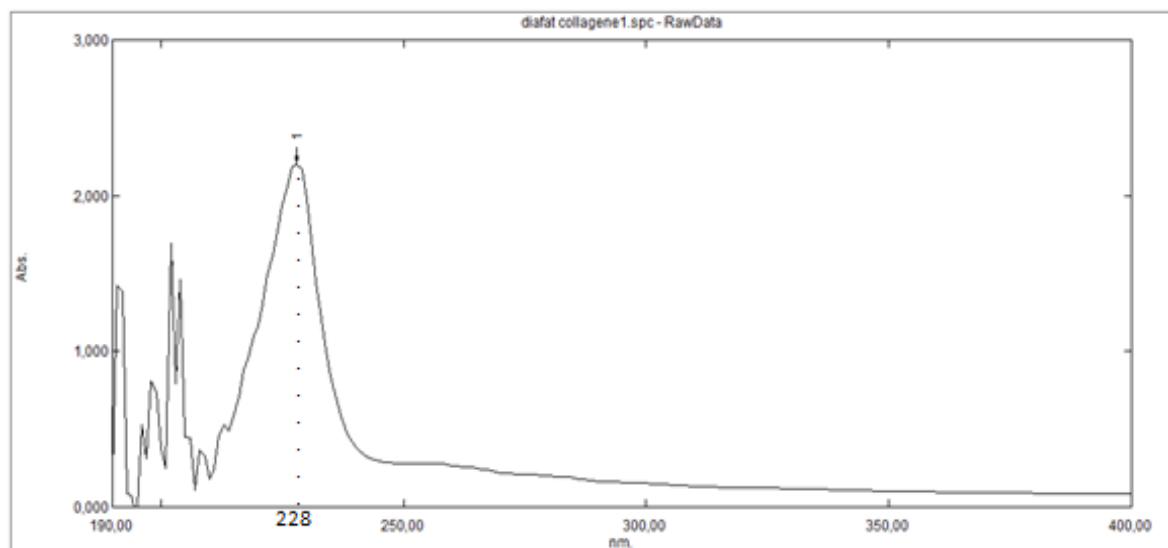


Figure 17 : Spectre d'absorbance de collagène II purifié

Le spectre de balayage a démontré une absorbance maximale à 228 nm, cette absorbance correspondant au collagène type II. Le spectre de collagène II était semblable au collagène de référence (sigma), qui est représenté dans la figure 18 :

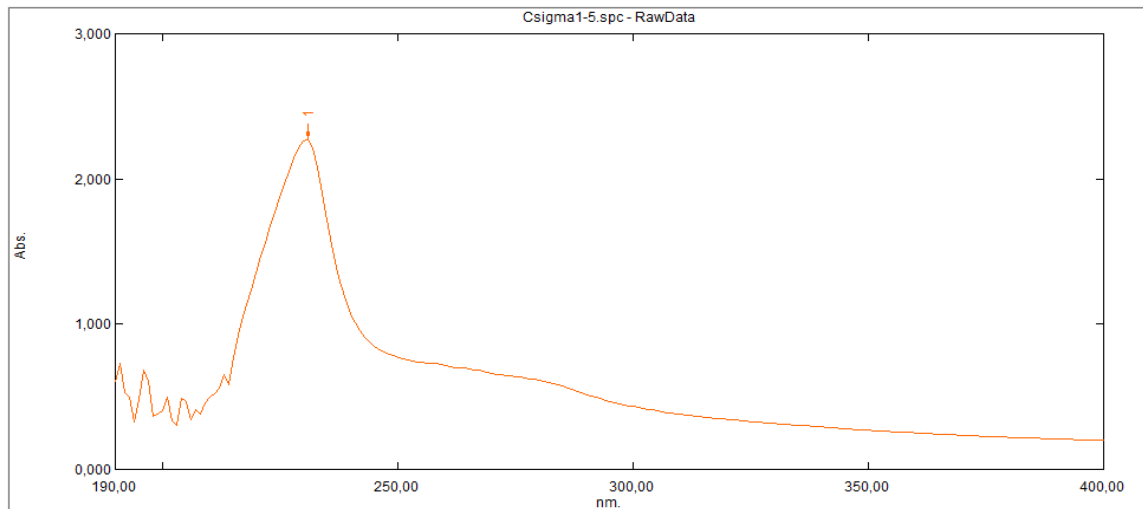


Figure 18 : Spectre d'absorbance de collagène (sigma)

IV.2.2. Le degré de pureté de CII par électrophorèse (SDS -PAGE)

Le degré de pureté de CII a été évalué par SDS-PAGE, les structures électrophorétiques des collagènes ont été analysées selon la méthode de Laemmli (1970). Le profil de SDS-PAGE est montré dans la figure 19 :

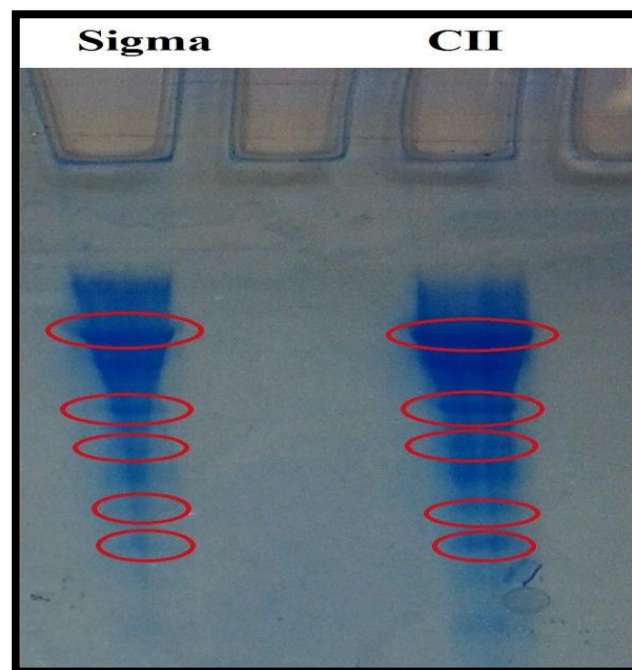


Figure 19 : Profil électrophorétique de SDS-PAGE pour le CII purifié et le collagène sigma.

Selon les structures électrophorétiques, on a obtenu 5 bandes de CII purifié de sternal cartilage, qui sont semblables aux bandes de collagène de référence (sigma).

IV.3. Le dosage de taux des protéines

La quantité de collagène est déterminée par le dosage de taux des protéines par la méthode de Bradford, en utilisant le spectrophotomètre UV-Visible .En réalisant une gamme d'étalonnage par le BSA, la courbe d'étalonnage obtenu est présenté dans la figure 20 :

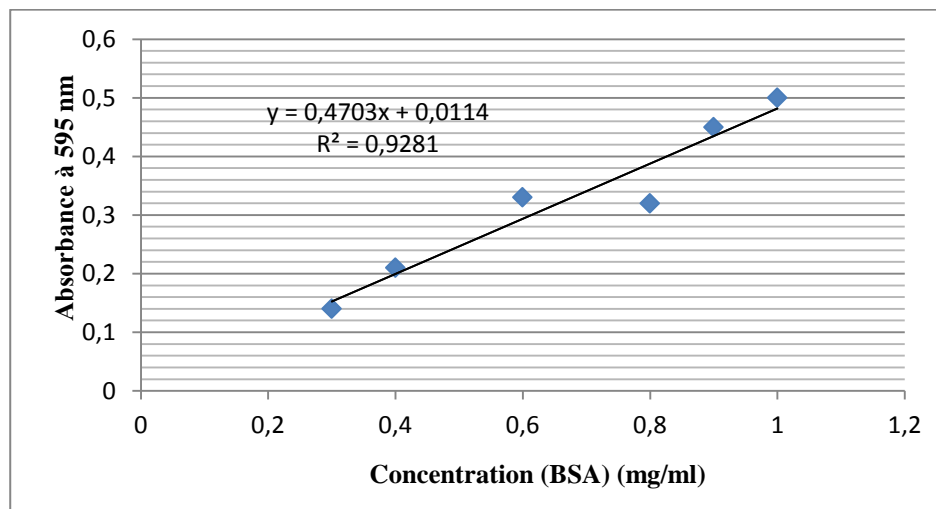


Figure 20 : La courbe d'étalonnage selon la méthode de Bradford(1967)

La concentration de collagène a été calculé à partir de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage de BSA est de : 1.36 mg/ml de protéine du collagène.

IV.4. L'activité biologique de collagène

Immunsation avec le collagène type II émulsifié avec ACF aux rats conduit à provoquer une arthrite sévère qui donne une réponse auto-immune. L'arthrite s'est développé rapidement chez les rats après l'injection, la sévérité de l'arthrite a été déterminée par, l'arthritique score, le changement des poids corporels et le nombre des pattes arthritiques.

IV.4.1. Incidence de l'arthrite :

Après 20 jours de la 1^{ère} immunisation avec le collagène II, on a constaté que 90% des rats testés ont montrés des signes de l'arthrite.

IV.4.2. Les signes cliniques de l'arthrite

La sévérité de l'arthrite a été évaluée sur un échelle de score 0-4 (normale 0=, maximum 4=).

Après 14 jours de la 1^{ère} immunisation chez les rats par le CII, l'apparition des signes cliniques (gonflement et/ou rougeurs des pattes) ont été observé, ces signes sont montrés dans la figure 21 :

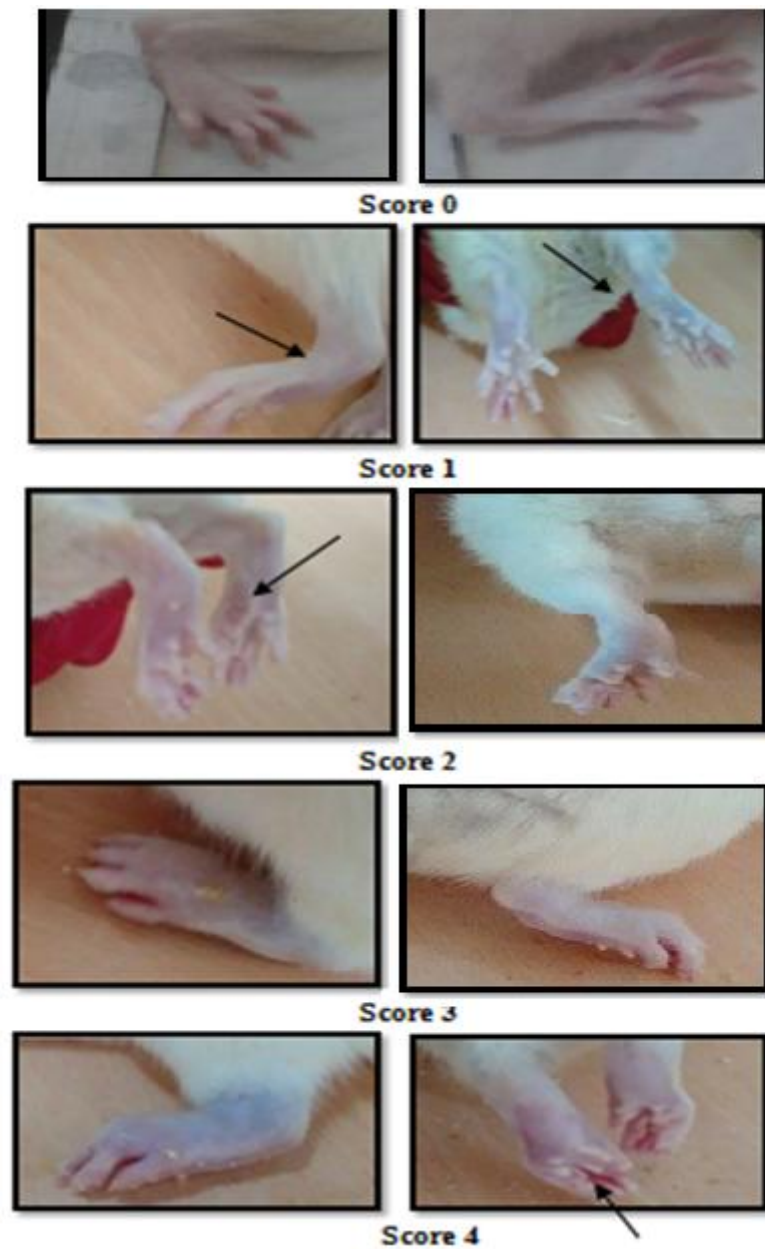


Figure 21: Les signes cliniques observés après le 14^{ème} jour de l'induction de l'arthrite par le CII.

IV.4.3. L'arthritique score

L'évaluation de l'arthrite est déterminée par l'arthritique score. Nous avons observé une augmentation progressive de l'arthritique score dans le groupe arthritique après le 14^{ème} jours de la 1^{ère} administration figure 22 :

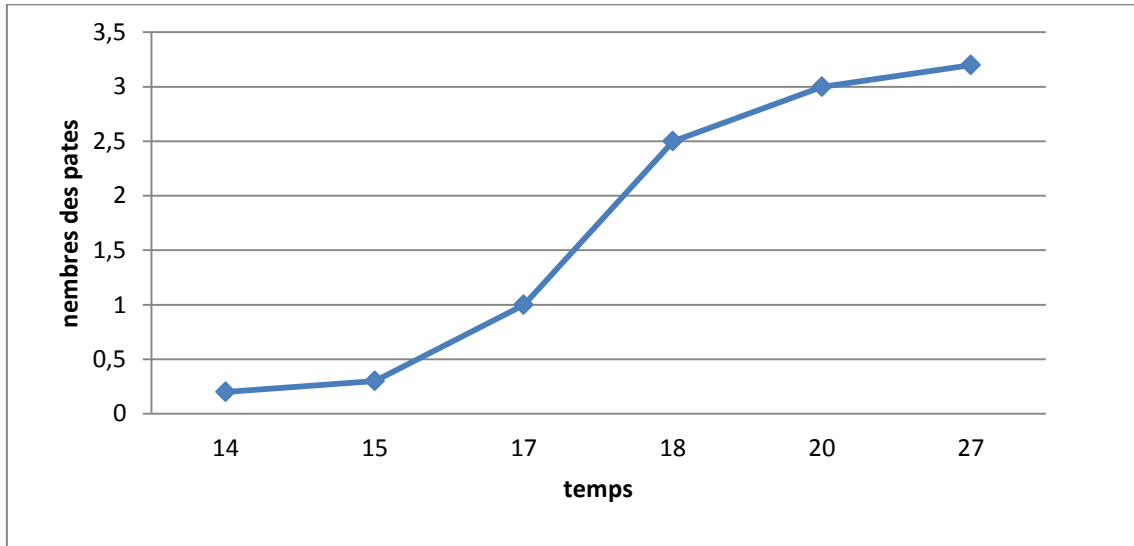


Figure 22: Evaluation de la sévérité de l'arthrite

IV.4.4. Evaluation du poids des rats

Le poids des rats arthritiques et les témoins a été suivi avant et après l'expérience, les variations de leurs poids sont montrés dans la figure 23:

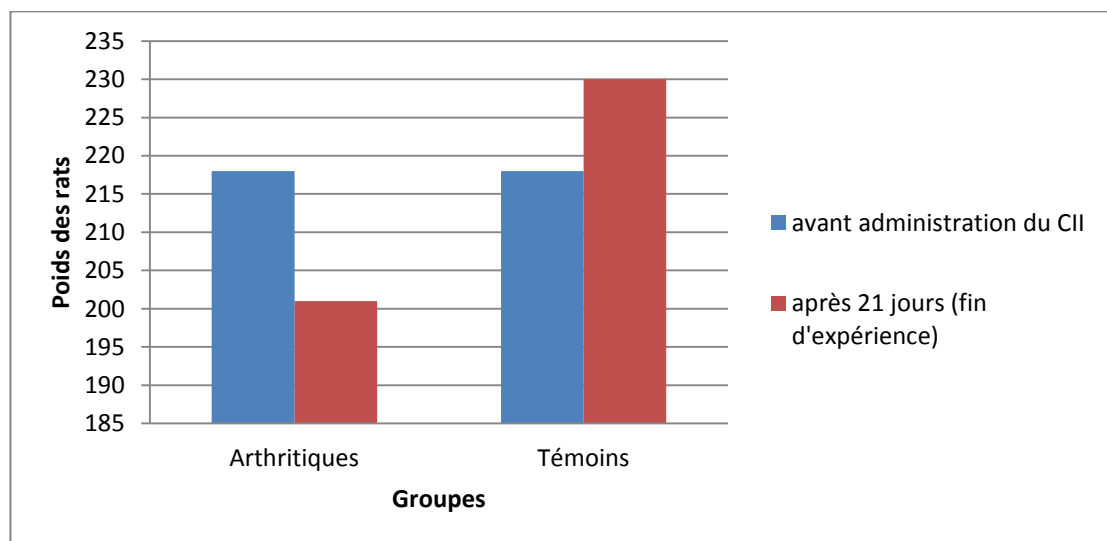


Figure 23: Variation du poids corporel des rats avant et après l'induction de l'arthrite

Une perte du poids a été observée chez les rats arthritiques après 21 jours de la 1^{ère} immunisation, par contre les rats témoins ont montré une augmentation du poids corporel à la fin d'expérience.

IV.4.5. Nombre des pattes arthritiques

Le nombre des pattes atteints par l'arthrite est un élément important pour l'évaluation de la sévérité de l'arthrite. L'CIA est détectable vers le 14^{ème} jour sur les pattes inférieure et supérieure, se traduisant par un gonflement et érythème des pattes ou fluxion des chevilles. L'atteinte débute vers le 14^{ème} jours (1^{ère} immunisation) et commence à augmenter avec le temps. On a constaté que le nombre des pattes arthritique augmente avec le temps et atteint jusqu'à 3,2. figure 24 :

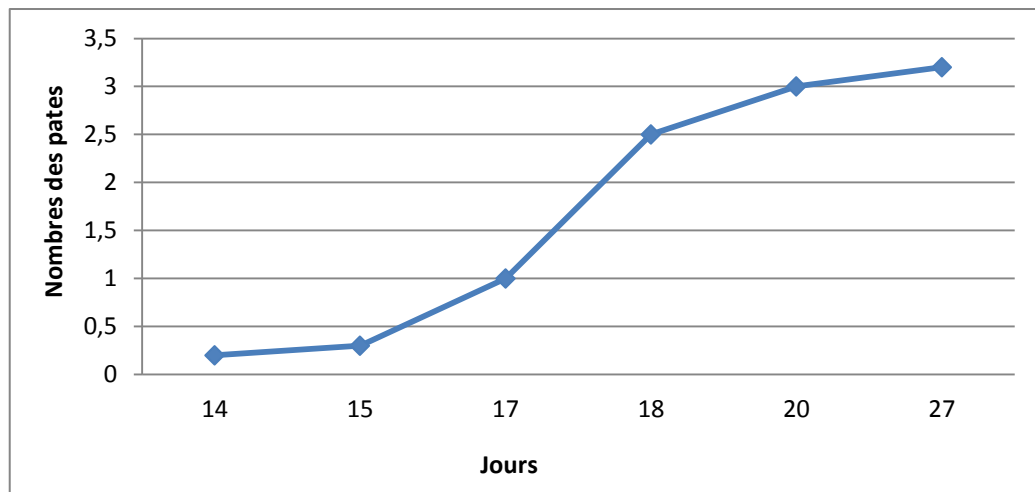


Figure 24 : Nombre des pattes arthritiques dans le groupe arthritique.

IV.4.2. Examen sanguin

IV.4.2.1. La vitesse de sédimentation

Le dosage sanguin permet également d'estimer l'intensité de l'inflammation retrouvée au cours de l'arthrite et d'en surveiller l'évolution. La VS est mesurée après 21 jours de l'administration de CII. On remarque que la VS chez le groupe arthritique est plus élevée que le groupe témoin figure 25 :

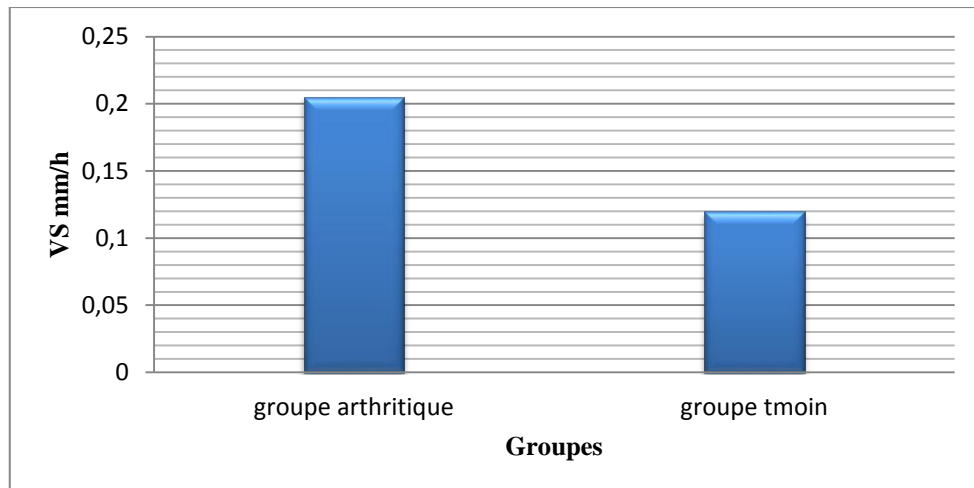


Figure 25 : VS après 21 jours de l'administration de CII

IV.4.2.6. Nombre des GB

Le nombre des globules blanc est également mesuré en cas d'inflammation, on a trouvé après l'examen que le nombre des globules blancs était $2,01 \times 10^9/l$ pour le groupe arthritique et $1,61 \times 10^9/l$ pour le groupe arthritique. figure 26 :

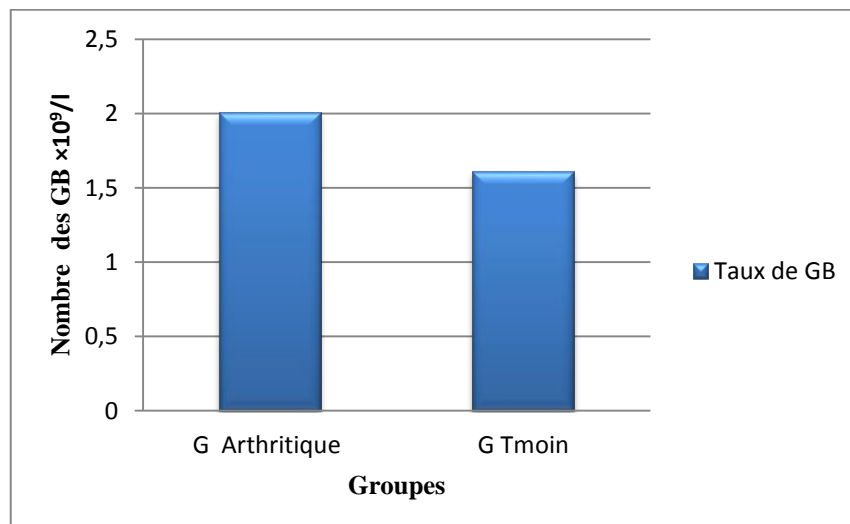


Figure 26 : Nombre des globules blancs des groupes arthritiques et témoins

IV.5. Effet curatifs de l'extrait éthanolique de Marrubie

IV.5.1. Score de l'arthrite

Le traitement par l'extrait de marrubie (150 mg / kg) commençant après 29 jours de la 1^{ère} immunisation. on a remarqué qu'il y a un changement des signes de l'arthrite (une

diminution de gonflement et rougeurs des pattes dans le groupe traité par apport au témoin (Positif)

Au début du traitement le score arthritique dans le groupe traité et témoin(+) était : 8.2 et 8.3 respectivement, le score de l'arthrite dans le dernier jour du traitement était 4.2 pour le groupe traité et 7 pour le groupe témoin (+), la progression de la maladie est nettement supprimée .figure 27 :

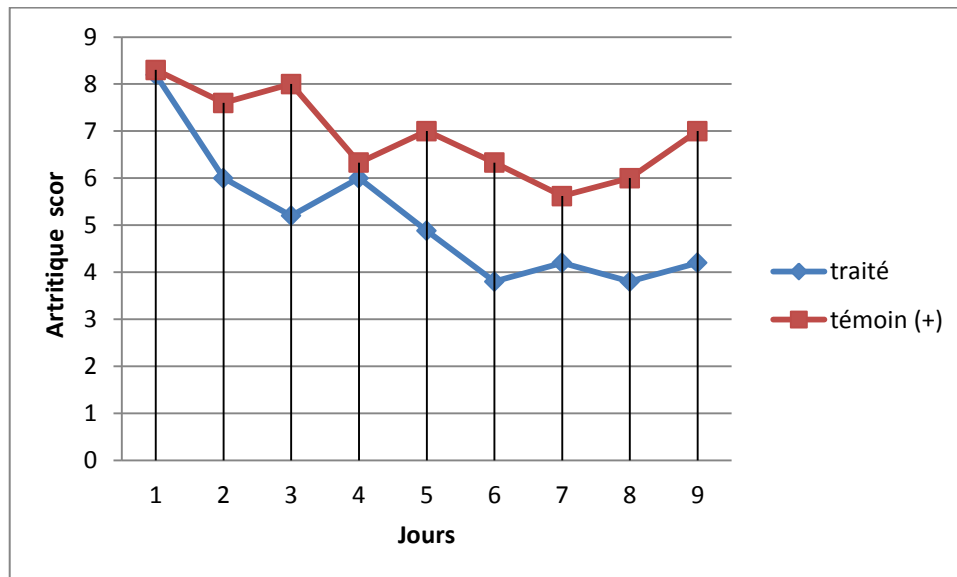


Figure 27: Evaluation de traitement de la plante Marrubie

IV.5.2. Examen sanguin

L'administration de l'extrait de Marrubie dans le groupe traité a diminué l'inflammation qui résulte une diminution du nombre du GB.

IV.5.2.1. Nombre des GB

L'extrait de la plante a corrigé les signes cliniques de l'athrite chez le groupe traité en diminuant le nombre de globules blancs. figure 23 :

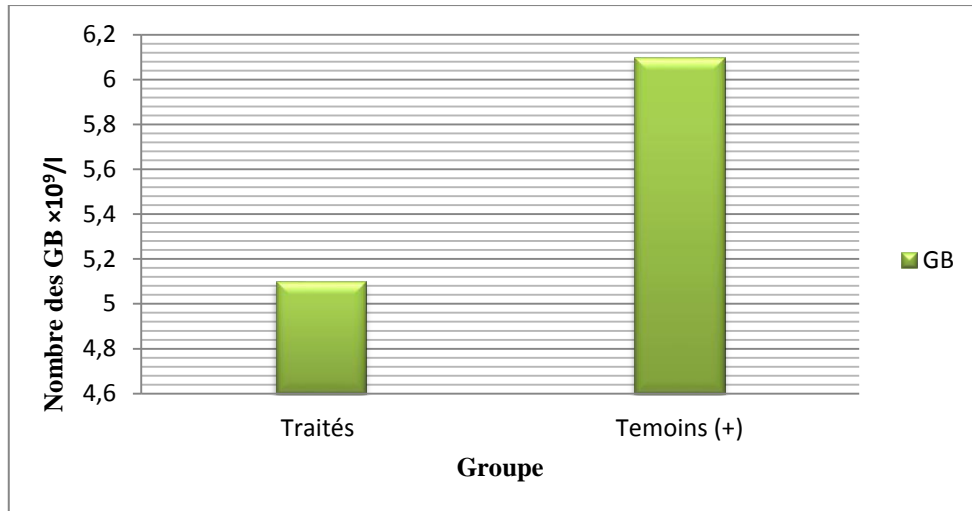


Figure 28: Le nombre des GB des groupes traités et témoins positif

IV. Discussion

Le collagène type II est un composant principal de la matrice extracellulaire du cartilage (Poole et *al.*, 2005), il fournit au cartilage sa résistance à la traction (Aubert-Foucher et *al.*, 2014). Le collagène type II avec sa structure moléculaire spécifique a été largement utilisé dans les produits alimentaires, pharmaceutiques, cosmétique en raison de son excellente biocompatibilité et la biodégradabilité (Cao et *al.*, 2013).

La purification du collagène type II à partir de sternale cartilage de poulet a donné un rendement de l'ordre de 0.36% du collagène type II.

Selon Edward et al (1996) le rendement de purification du CII varie considérablement avec les espèces et la source du tissu, généralement 1% à 3% du poids initial de cartilage peuvent être récupérés en tant que CII.

Le spectre de balayage UV-Visible (entre 190-400 nm) du CII montre une absorbance maximale à 228 nanomètre. Dans la présente étude, le CII a montré une absence totale d'absorbance entre 260- 280 nanomètre. C'était dû à un bas contenu de tyrosine (2-8 résidus par 1000 résidus), qui absorbe la lumière UV à 280 nanomètre, cette absence indique l'absence aussi d'autres protéines. L'absence d'absorption à 280 nanomètre indique la pureté du collagène et de l'efficacité d'élimination de protéine non collagèneux, ceci indique à efficacité proportionnée des procédés d'isolement de collagène. La comparaison entre le pique obtenu de CII avec le pique sigma, on constate qu'il ya une ressemblance entre les 2 piques. Après comparaison avec le collagène de sigma et l'absence des piques à 280 nm en confirmant que le collagène II purifié est pure. En comparaison avec l'étude de Jeevithana et *al* (2014) dont le CII a été mesuré sur une longueur d'onde entre 190-400nm, le spectre a montré une absorbance maximale à 237.7

L'électrophorèse SDS-PAGE sur le gel de polyacrylamide a été effectuée pour la détermination de la pureté du collagène type II, Le CII purifié a montré 5 bandes semblables au collagène de référence (sigma).

Des rats Albinos wistar ont été immunisés par un même volume de CII émulsifié avec ACF et AIF par une administration intradermique au niveau de la queue. L'incidence de l'arthrite était 90% des rats utilisés ont montré des signes de l'arthrite c'est-à-dire le collagène obtenu a une activité arthritogène.

Les rats ont été également surveillés par le score de l'arthrite basé sur un système de notation de 0-4, un système de mesure permet de suivre l'évolution de l'arthrite et permet de mesurer la progression de la maladie ou l'effet d'un traitement.

Après l'apparition des signes arthritiques, rougeur et gonflements des pattes, une perte de poids et une augmentation de score de l'arthrite commence après le 14^{ème} jour de la première administration du CII (l'apparition de l'arthrite), on peut dire que l'arthrite est la cause de la perte du poids.

Il est utile au moment de faire une prise de sang à la fin d'expérience (la provocation de l'arthrite), pour suivre l'arthrite afin de confirmer le diagnostic de la maladie. On effectuant un dosage sanguin de VS et nombre des globules blancs. Le nombre des GB et de VS est plus élevé chez le groupe arthritique par rapport au groupe témoin. Un nombre élevé de globules blancs indique que le corps est en train de lutter contre une inflammation, et parmi les causes de l'augmentation de la VS est l'inflammation chronique et la présence d'une maladie auto-immune, la tendance à la formation d'amas, consécutive à ces mécanismes, conduit à une accélération de la sédimentation. La vitesse de sédimentation utilisé comme marqueur de l'inflammation, de l'importance de la réaction en phase aiguë

Le système immunitaire ne reconnaît plus le Collagène de soi et non soi et réagit comme étant un corps étranger. Cette erreur d'identification pousse le système immunitaire à s'attaquer aux tissus et articulations, causant les signes d'arthrite (gonflement des pattes et rougeur des chevilles)

Le traitement de la maladie par l'extrait de marrubie (150 mg / kg) commençant après 29 jours de l'induction de l'arthrite (la 1^{ère} immunisation), les signes cliniques de l'arthrite ont été diminués chez le groupe traité par rapport au groupe témoin (+)

Nous avons remarqué que le gonflement et les rougeurs des pattes de groupe traité ont été diminués par rapport au témoin positif après le début de traitement, en revanche le score arthritique de groupe traité a été abaissé dans la période de traitement par rapport au témoin (+), ce qui indique que l'extrait de marrube a un effet antiarthritique.

Nous avons observé que pour le groupe traité le nombre des GB est moins chez le groupe arthritique que le témoin positif, alors on peut dire que l'extrait de marrubie a un effet sur la diminution des signes cliniques de la maladie, et qui résulte à une diminution du nombre des GB. Ces résultats montrent que l'extrait de marrubie a un effet anti-arthritique.

Conclusion

Les suppléments alimentaires sont des sources concentrées de nutriments (vitamines, minéraux, et aussi des substances d'origine animale comme le collagène). Le collagène est une protéine fibrillaire essentielle dans la constitution du tissu conjonctif et permettant une certaine résistance et l'élasticité des tissus. Le collagène type II (CII) est un type essentiel du collagène, se retrouve essentiellement dans le cartilage, il est largement utilisé dans les produits alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques.

Cette étude, portée sur la purification du CII à partir de sternal cartilage de poulet, on a obtenu un rendement de purification de l'ordre de 0,36% .

Pour tester l'activité biologique de CII purifié, des rats Albino Wister ont été immunisés par le collagène émulsifié avec ACF et AIF, 90% des animaux ont montré les signes de l'inflammation (gonflement et rougeurs des pattes), ce qui confirme l'activité arthritogène du CII purifié.

Le traitement par l'extrait éthanolique de la plante marrubie a montré une diminution des signes d'inflammation chez les rats arthritiques (arthritique score et NGB), ce qui assure que l'extrait de marrubie a un effet antiarthritique.

Malgré que les résultats de cette étude sont encourageants, mais il faut faire des études ultérieures impliquant :

Pour prouver l'efficacité des méthodes de purification il faut analyser le collagène type II obtenu par : infrarouge, et HPLC

Pour tester l'activité biologique du collagène il faut :

- Dosage anticorps-anti collagène
- Dosage des cytokines pro-inflammatoires (IL₁, IL₆, TNF α)
- Faire des coupes histologiques pour voir la dégradation du cartilage et l'os

Tester l'activité collagène II comme un médicament contre l'arthrite.

Le traitement par la plante Marrubie est une étude préliminaire, il faut refaire cette étude avec un nombre suffisant des animaux, ainsi que l'utilisation des différentes doses de la plante, et aussi l'utilisation d'un médicament de référence anti-arthritique.

Références bibliographiques

- “Décret n° 2006-352 du 20 mars (2006) relatif aux compléments alimentaires” *Journal Officiel* du 25 Mars 2006. Pp: 4543-4546.
- Adrian F .(2011).Maladies rhumatismales : La polyarthrite rhumatoïde .Edition 2011 ligue suisse contre le rhumatisme.Pp :10-12.
- Alemán A., Martínez-Alvarez O.(2008). Marine collagen as a source of bioactive molecules.Pp :2-5.
- Ali Boutlelis.D.(2014).Etude phytochimique et activité antimicrobienne ,antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou Marrubium vulgare L.Thèse de doctorat. Pp :17.
- Aubert-Foucher.E., Mayer N ., Marielle P., Aurélie P.,Hartmann D., Mallein Gerin.F.(2014) . A unique tool to selectively detect the chondrogenic IIB form of human type II procollagen protein. **34** .Pp:80–88.
- Bradford M.M.,(1976).A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*Analytical Biochemistry*.**72**.Pp: 248-254.
- Cao H., Shi-Ying X .(2007).Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage .; *Food Chemistry* .**108**. (2008) Pp : 439–445
- Cao,H., SHI,F.X., XU,F., YU,J.S .(2013).Molecular structure and physicochemical properties of pepsin-solubilized type II collagen from the chick sternal cartilage .**17**. Pp: 1427 -1428
- Caro L.,Cayrol C., Dalem E., Esseghir S .(2010).les compléments alimentaires.Pp :6-7 .
- Caroline L.C.(2005).La dépêche dans la rubrique (biotechnologies).Dans les peaux,les meilleurs onguents.**6** (3).Pp :334.
- Christina C-S., Banquerigo M.L., Hamas S., Navab M., Grace S.P., Brian JV.L., Alan C.W., Alan M., Brahn E.(2008).Treatment with an apolipoprotein A-1 mimetic peptide in combination with paravastatin inhibits collagen-induced arthritis.*Clinical Immunology*.**127**.Pp:234-244.
- Combe B.(2006).Qu’est-ce que la polyarthrite rhumatoïde ?.*Immuno-Rhumatologie. Journal de L’AFP*.Pp :1-3.
- Combe C et René-Marc F.(2008).Traitement de la polyarthrite rhumatoïde de l’adulte.Pp:49
- Cowin S.C.(2000).Do liquid crystal-like flow processes occur in the supramolecular assembly of biological tissues?.*Non-Newtonian Fluid Mech*.**199**.Pp:155-162.
- David E, Roselyn A.(1993). Effects of oral administration of type. I collagen on rheumatoid arthritis.**24** .Pp :1727-1729. in: Cao,H et al. (2013).Molecular structure and physicochemical properties of pepsin-solubilized type II collagen from the chick sternal cartilage.Pp : 1427 -1428.
- Defilippi P.,Van Hinsbergh V.,Bertolotto A.,Rossino P.,Silengo L.Tarone G.(1991).Differential distribution and modulation of expression of Alpha1/Beta1 integrin on human endothelial cells.*Journal of Cell Biology*.**114**.Pp: 855-863.
- Drugs ., Mar., Elango J., Bin B ., Yongshi B., Yu Z., Qingbo Z and Wenhui W .(2014) ,Type II Collagen and Gelatin from Silvertip Shark (*Carcharhinus albimarginatus*) Cartilage: Isolation, Purification, Physicochemical and Antioxidant Properties.**12**. Pp: 3852-3873.
- Edward.F.,Rosloniec.,CremerM.,AndrewKang.,LindaK.,Myers.(1996).Protocols in *Immunology*.**15**(5).Pp:1-24.
- El Bikai R .(2010).l’étude de l’interaction entre les chondrocytes et le collagène modifié par le 4-hydroxynonéal : Implication dans le développement de l’arthrose.**141** .Pp : 4-6.

- Garcia, G., Komagata Y., Slavin, A.J., Maron R., Weiner H.L. (1999). Suppression of collagen-induced arthritis by oral or nasal administration of type II collagen. *J. Autoimmun.*, 13, Pp :315–324. ,in: *Drugs M* ., Elango J ., Bin B ., Yongshi B ., Yu Z ., Qingbo Z and Wenhui W .(2014) . Type II Collagen and Gelatin from Silvertip Shark (*Carcharhinus albimarginatus*) Cartilage: Isolation, Purification, Physicochemical and Antioxidant Properties. **12**.Pp:3852-3873.
- Gelse K, Pöschl E, Aigner T.(2003). Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug.Deliv. Rev.*; **55**: 1531-46.in : Vigier S (2008). matrices fibrillaires denses de collagène : matériaux pour la réparation osseuse et l'étude d'ostéoblastes en trois dimensions . Thèse de doctorat. université pierre et marie curie.Pp :39
- Gobeaux F.(2007).Phase dense de collagène de type I:transition isotrop / cholestérique , fibrillogenèse et minéralisation .Thèse de doctorat.université Pierre et Marie Curie .Pp :16.
- Grinnell F. (1994). Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *The Journal of Cell Biology*.**124**(4). Pp:401–404.
- Hans Peter B., Kazunori M., Janice A. Vranka., and Sergei P. Boudko. (2010).Collagen Formation and Structure .Pp:469-530.
- Hayder M.(2011).Utilisation d'un dendrimère phosphoré comme une nouvelle approche thérapeutique de la polyarthrite rhumatoïde. thèse de doctorat.Université de toulouse.Pp :202.
- Hinterwaldner R . (1977) . Raw materials. In: Ward A.G ., Courts A .(1977).The science and technology of gelatins. *Academic Press*.Pp : 295-314.
- <http://www.cochrane.org/fr/CD002948/phytotherapie-contre-la-polyarthrite-rhumatoide>
- <http://www.creapharma.fr/N1776/harpagophytum.html>
- http://www.lepoint.fr/sante/5-plantes-contre-l-arthrose-et-les-douleurs-rhumatismales-07-01-2014-1777662_40.php
- Hulmes , D.J.S. (2002) .Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *Journal of Structural Biology*.**137**.Pp :(1-2) Pp :2-10, ,in : Strupler M (2008).Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique application aux fibres rénales .Pp :12-15
- Jeevithan E., Wua W., Wang Nanping., Lan H., Bao B.(2014). Isolation, purification and characterization of pepsin soluble collagen isolated from silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) skeletal and head bone . *Process Biochemistry*. **49**.Pp:1767-1777.
- Judd W.S., et al . (2002). Botanique systématique: Une perspective phylogénétique . pp :369-384.
- Jung H.W , Jin Ki Jung , Kun Ho Son c, Dong Hwa Lee , Tae Min Kang , Young Shik Kim ,Yong-Ki Park.(2012). Inhibitory effects of the root extract of *Dipsacus asperoides* C.Y. Cheng et al T.M.Ai on collagen-induced arthritis in mice. *Ethnopharmacology* .**139**.98–103
- Kadler K.E .,Baldock C.,Bella J .,Boot-Handford R.P.(2007).collagens at a Glance.*J. cell science*.**120**.Pp:1955-1958,in: Gobeaux F (2007).Phase dense de collagène de type I:transition isotrop/cholestérique,fibrillogenèse et minéralisation .Thèse de doctorat.université Pierre et Marie Curie .Pp :16 .

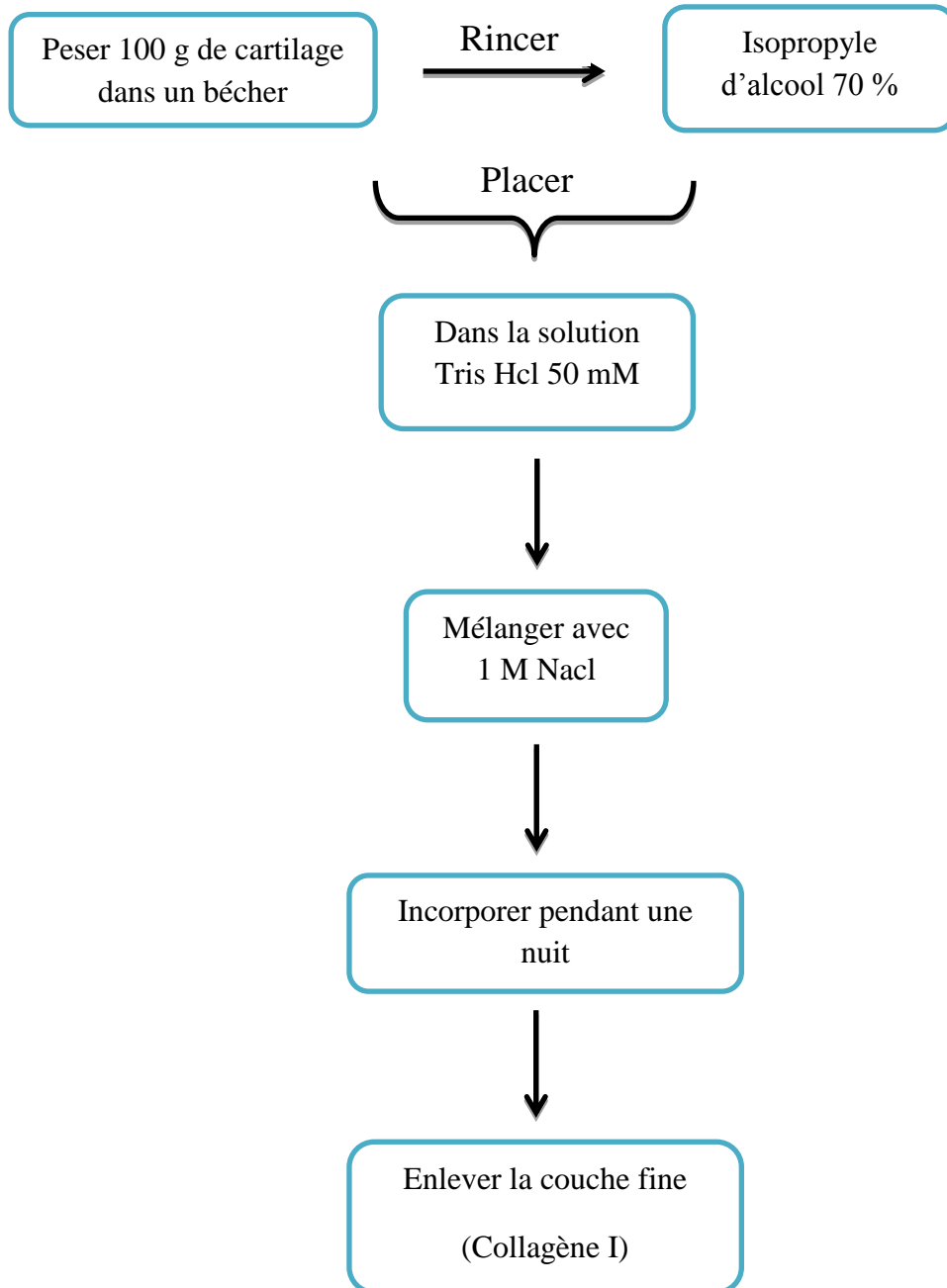
- Kim S.K. et Mendis E .(2006).Bioactive compounds from marine processing byproduct.*Food Research International* .**39**. Pp :38-393
- Klareskog L, Padyukov L, Rönnelid J, Alfredsson L. Genes .(2006).Environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis *Curr Opin Immunol*.**18**(6).Pp:650-5.
- Kramer R.H., Cheng Y.F.,Clyman R.(1990).Human microvascular endothelial cells use b1 and b3 integrin receptor complexes to attach to laminin. *Journal of Cell Biology*.**111**.Pp: 1233-1243.
- Kraus A.L.(1980). Research methodology- In Baker H.J., Lindsey J.R., Weisbroth S.H. - *The Laboratory Rat Vol 2*- Academic Press- Chap 1.Pp: 5-19.
- Lablack M. (2011) .Extraction et purification du collagène a partir de la peau et des écailles de tilapia du nil adult (*Oreochromes niloticus*) .Thèse de magister.Université d’oran. Pp :6-23
- Laemmli U.K.(1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* .**227**(5259).Pp:680-685.
- Ludovic C .(2008).Acquisition des qualites organoleptiques de la viande bovine: adaptation a la demande du consommateur.Thèse de doctorat.Ecole nationale vétérinaire.Pp :11-15.
- Markham K.R .(1982).Techniques of flavonoide identification. Academic press. Chap 1and 2.Pp :1-113
- Messer C .(2012) .Complements Alimentaires A Base De Plantes Et Medicaments A Base de Plantes : Differences Et Similitudes.thèse de doctorat en pharmacie.université de Lorraine .Pp : 20 .
- Musset L et Gillani-Dalbin P.(2013).La polyarthrite rhumatoide : apport de la biologie au diagnostic et au suivi thérapeutique.*Revue générale et analyses prospectives*.**28**.Pp :281-286.
- Ozenda P.(2004). Flore et végétation des sahara. 3éme Ed : CNRS édition. Paris. pp.399-402.
- Peter H.L.,Susane D,(2007).une vitesse de sedimentation augmentée.forum Med Suisse. **7**.Pp:765-769.
- Poole, A.R. Koopman, W.J., Moreland, L.W., Eds.; Williams and Wilkins.(2005). Cartilage in Health and Disease. In *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology* . Pp. 223–269 ,in : Mar. D., Elango., Bin B ., Yongshi B., Yu Z., Qingbo Z and Wenhui Wu.(2014).Type II Collagen and gelatin from Silvertip Shark (*Carcharhinus albimarginatus*) Cartilage: Isolation, Purification, physicochemical and antioxidant properties.**12**.Pp : 3852-3873.
- Reddy,G.K et Enwemeka,C.S.(1996).A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissue. *Clinical Biochemistry*.**29**.3225–3229.
- Robillard .(2013).Ce que la science nous dit sur nos articulation .Pp : 13
- Senaratne L.S., Park P.J. et Kim S.K .(2006) . Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology* .**97**(2) .Pp: 191-197.
- Senaratne L.S.,Park P.J et Kim S.k. (2006) .Isola , 97ytion and characterization of collagen from brown bached (*Lagocephalus gloveri*) skin .*Bioresource Technolog*.**97**(2).Pp:191-197.
- Shalaw Fawzi .Grancher .(2006) .Influence des facteurs biochimiques et mécaniques in vitro sur la prolifération cellulaire et la synthèse matricielle de fibroblastes. Applications en Ingénierie tissulaire . Thèse de doctorat.ecole doctorale biologie.Pp :33.
- Strupler M .(2008).Imagerie du collagène par microscopie multiphotonique Application aux fibroses rénales .Pp :12-15
- Taipale J et J. Keski-Oja. (1997). Growth factors in the extracellular matrix.*J.The Faseb***11**(1).Pp :51–59 .

- Tomasek J.J., Gabbiani G., Hinz B., Chaponnier C., Brown R.A.(2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Cell Biology*. **3**.Pp :349–363.
- Trentham D.E., Towns A.s., Kang A.H.(1977).Autoimmunity to type II collagen:An experimental model of arthritis.*J.Exp.Med.***146**.Pp:857-869.
- Trenthamde , Dynesius-Trentham RA, Orav E, Combitch D, Lorenzo L, Sewell KL, Hafler D, Weiner H.(1993) .Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science*; **261**.Pp: 1727-1730. in: Cao,H et al. (2013) . Molecular structure and physicochemical properties of pepsin-solubilized type II collagen from the chick sternal cartilage. Pp : 1427 -1428.
- Van der Rest M et Garonne R .(1992).collagen family of proteins.Faseb J.5.Pp :2814-2823,in : Gobeaux F .(2007).Phase dense de collagène de type I:transition isotrop/cholestérique,fibrillogenèse et minéralisation.Thèsede docotarat.université Pierre et Marie Curie .Pp :16.
- Van der rest M et Garrone R . (1991). collagen family of proteins.Pp: 2814-2823 .
- Van der rest M. et Bruckner P (1993). Collagens: Diversity at the Molecular and Supramolecular and Supramolecular Levels.*Current Opinion in Structural Biology* **3**(3).Pp:430-436 .in:Gobeaux F (2007).Phase dense de collagène de type I:transition isotrop/cholestérique,fibrillogenèse et minéralisation .Thèse de docotarat.université Pierre et Marie Curie .Pp :16.
- Vigier S .(2008). matrices fibrillaires denses de collagène : matériaux pour la réparation osseuse et l'étude d'ostéoblastes en trois dimensions . Thèse de doctorat. université pierre et marie curie .Pp :38-39
- Yan W .(2012). Elaboration de modèles collagène/apatite pour l'étude de la biominéralisation du tissu osseux. Thèse de Doctorat .Université de Pierre et Marie Curie.Pp :6-7.
- Zague V., Freitas V., Costa Rosa M., Castro G., Ruy G., Jaeger.,Gláucia M., Santelli M. (2011).Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses matrix metalloproteinase 2 activity. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD J Med Food*. **14** (6). Pp:618–624.
- Zhang Y., Liu W., Li G., Shi B., Miao Y. et Wu X. (2007) . Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Food Chemistry*. **103**.Pp: 906-912.
- Zhao, W.; Tong, T.; Wang, L.; Li, P.P.; Chang, Y.; Zhang, L.L.; Wei, W.(2011) .Chicken type II collagen induced immune tolerance of mesenteric lymph node lymphocytes by enhancing beta2-adrenergic receptor desensitization in rats with collagen-induced arthritis. *Int. Immunopharmacol.*, **11**, Pp :12–18. ,in: Drugs M ., Elango J ., Bin B ., Yongshi B ., Yu Z ., Qingbo Z and Wenhui W (2014) .Type II Collagen and Gelatin from Silvertip Shark(*Carcharhinus albimarginatus*) Cartilage:Isolation,Purification,Physicochemical and Antioxidant Properties.**12**.Pp:3852-3873.
- Zhong, Y., Khan, M.A., Shahidi, F. (2007). Compositional characteristics and antioxidant properties of Fresh and Processed Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*). *J. Agric. Food Chem.***55**.Pp :1188–1192. ,in: Drugs M ., Elango J ., Bin B ., Yongshi B ., Yu Z ., Qingbo Z and Wenhui W (2014).Type II Collagen and Gelatin from Silvertip Shark (*Carcharhinus albimarginatus*) Cartilage: Isolation, Purification, Physicochemical and Antioxidant Properties.**12**.Pp:3852-3873.
- Zhu, B.,Dong, X., Zhou, D.,Gao, Y.,Yang, J., Li, D., Zhao, X., Rena, T.,Yea, W., Tana, H., Wua, H.,Yu. C.(2012). Physicochemical properties and radical scavenging capacities of pepsin-solubilized collagen from sea cucumber (*Stichopus japonicas*). *Food Hydrocoll.***28**. Pp :182–188.

- Zhuang, Y.; Zhao, X.; Li, B .(2009). Optimization of antioxidant activity by response surface methodology in hydrolysates of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) umbrella collagen. *Zhejiang Univ. Sci. B*, **10**, Pp :572–579. ,in: Drugs M ., Elango J ., Bin B ., Yongshi B ., Yu Z ., Qingbo Z and Wenhui W (2014) . Type II Collagen and Gelatin from Silvertip Shark (*Carcharhinus albimarginatus*) Cartilage: Isolation, Purification, Physicochemical and Antioxidant Properties. **12**.Pp:3852-3873

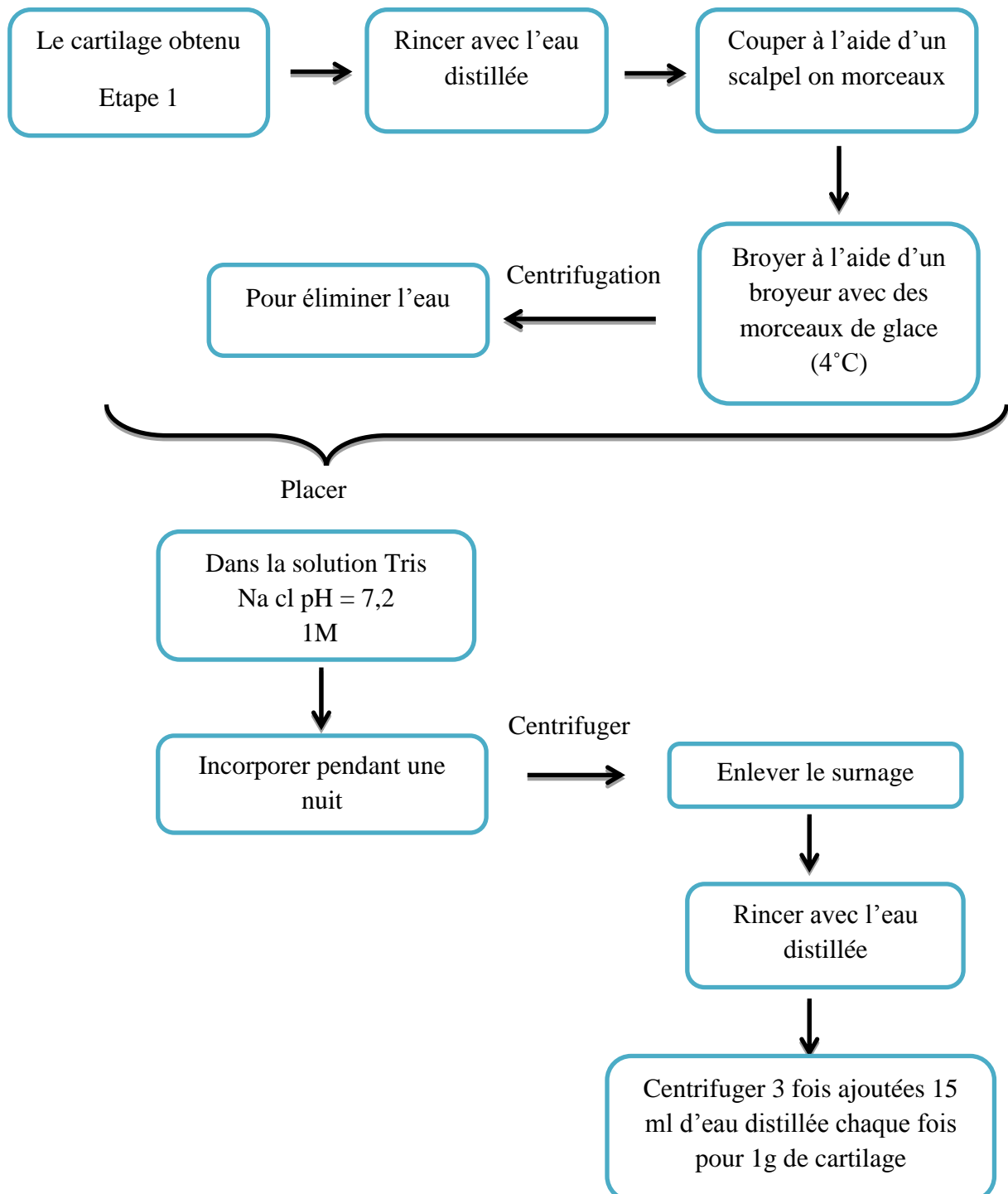
Guide Pratique	Mode opératoire /Enregistrement	
	Purification du collagène II Etape 1 : <i>élimination du collagène I</i>	

Mode opératoire :



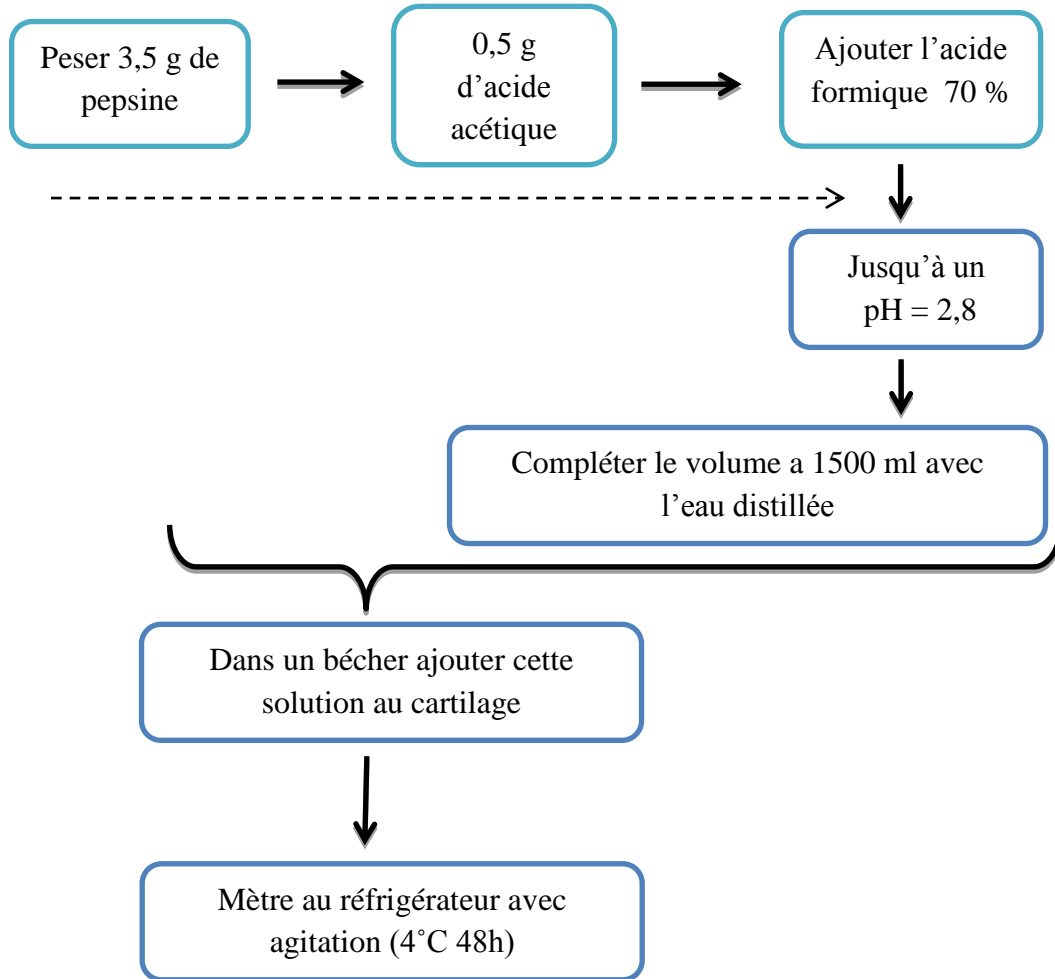
Guide Pratique	Mode opératoire /Enregistrement	
	Purification du collagène II Etape 2 : <i>élimination du proteoglycane</i>	

Mode opératoire :

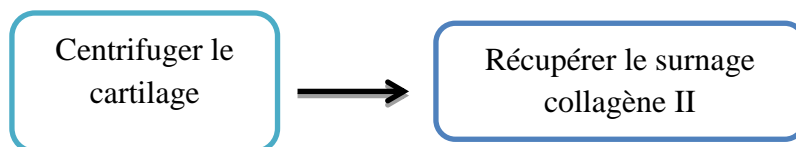


Guide Pratique	Mode opératoire /Enregistrement	
	Purification du collagène II Etape 3 :	

Mode opératoire :

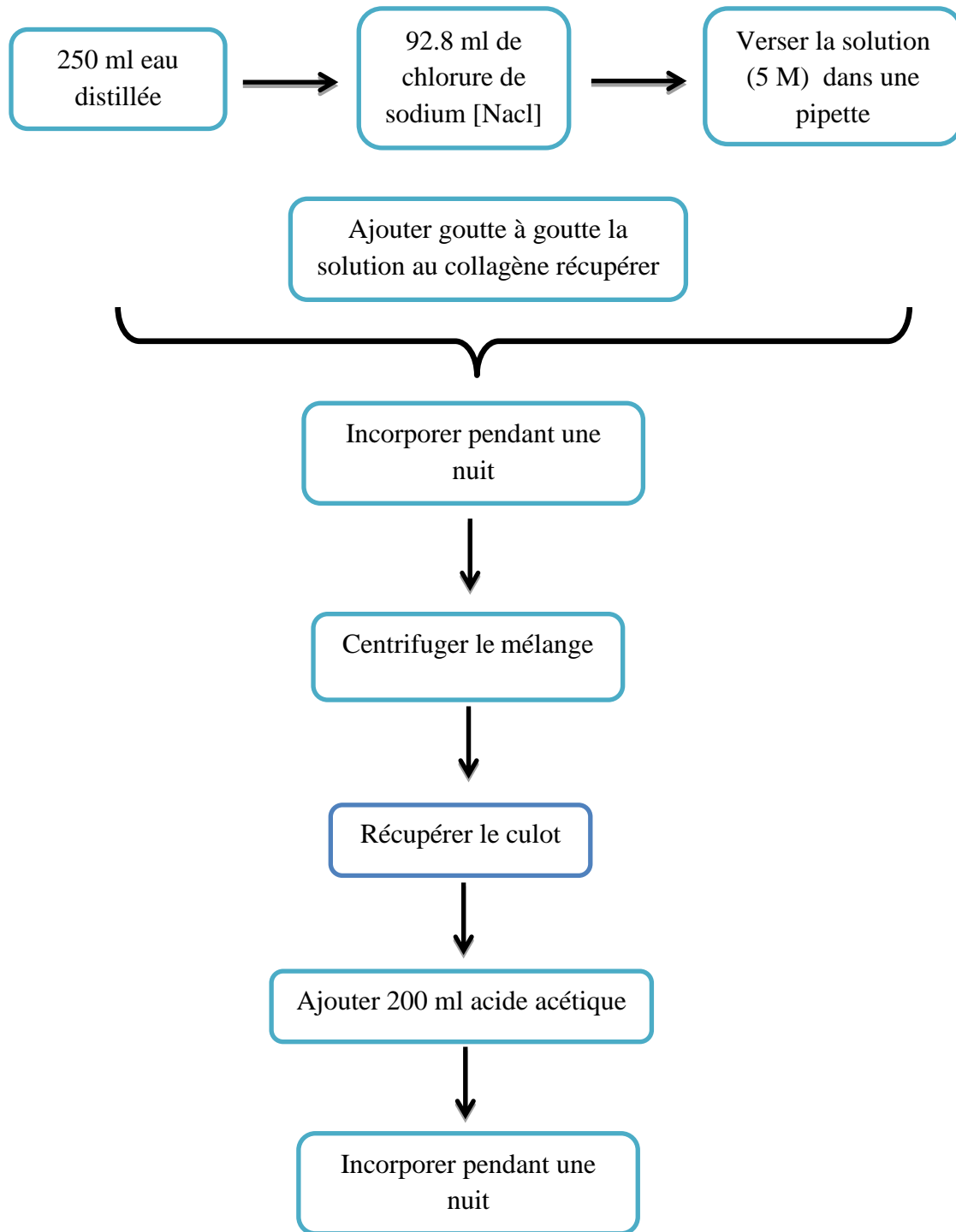


Etape 4 :



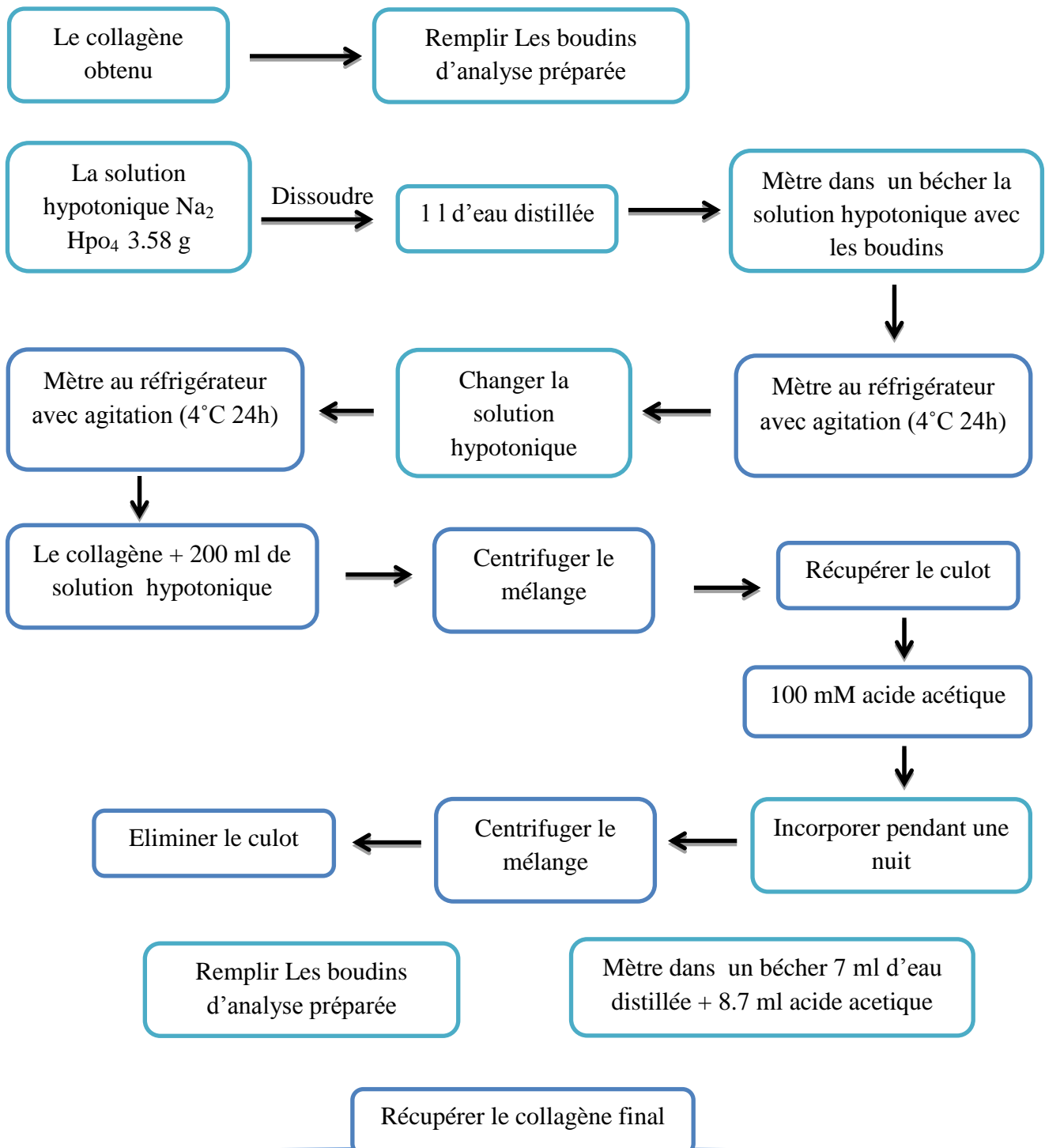
Guide Pratique	Mode opératoire /Enregistrement	
	Purification du collagène II Etape 5:	

Mode opératoire :



Guide Pratique	Mode opératoire /Enregistrement	
	Purification du collagène II Etape 6:	

Mode opératoire :



Guide Pratique	Mode opératoire /Enregistrement	
	Collagène II administré	

1^{ère} immunisation

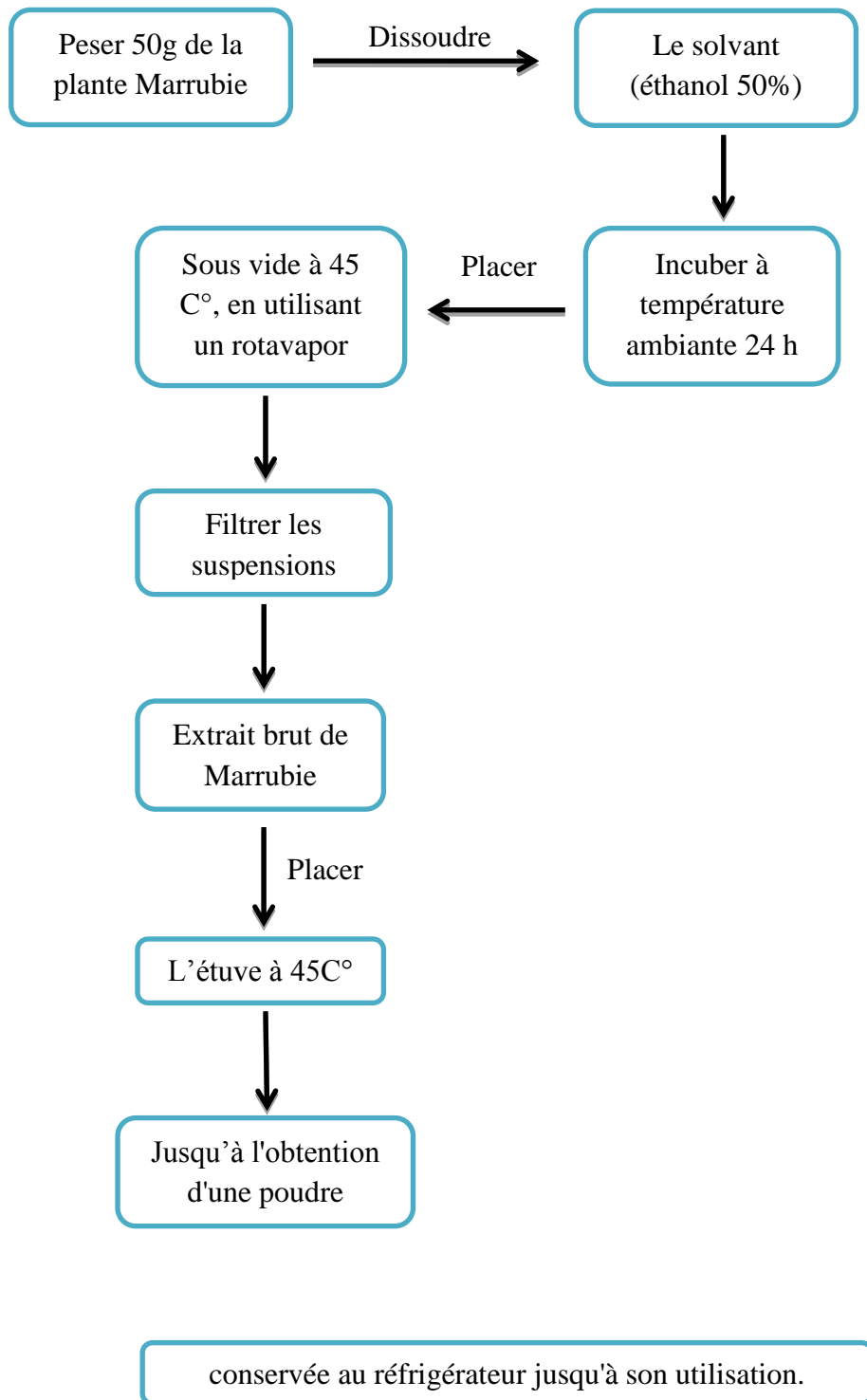
Rats	Poids des rats (g)	Collagène II administré (µl)
1	234	110
2	230	110
3	245	120
4	230	110
5	190	100
6	205	100
7	212	100
8	214	100
9	230	150
10	220	110

2^{ème} immunisation

Rats	Poids des rats (g)	Collagène II administré (µl)
1	230	115
2	186	93
3	226	113
4	228	114
5	220	110
6	210	105
7	215	108
8	226	113
9	235	118
10	208	104

Guide Pratique	Mode opératoire /Enregistrement	
	extraction à partir de plante Marrubie	

1. Mode opératoire



Résumé :

Les suppléments alimentaires sont des denrées alimentaires dont ils permettent de prévenir ou de compenser les carences dans un régime alimentaire normal. Le collagène représente une source intéressante du complément alimentaire à cause de ces effets bénéfiques sur la santé.

Le collagène est une protéine qui constitue la majorité des tissus de l'organisme, parmi les types de collagène on trouve un type largement répandu, il s'agit du collagène type II (CII). Le CII fait former des fibrilles, ce réseau fibrillaire fournit la résistance à la traction du tissu cartilagineux. Il est largement utilisé dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

Dans notre étude, on a purifié le CII à partir du sternal cartilage du poulet qui est également une bonne source du CII, avec un rendement de 0.36% .

La pureté de collagène purifié a été testée par deux méthodes :

Une analyse spectroscopique : le spectre d'absorbance en UV-Visible a montré une absorbance maximale de collagène à 228 nm qui était semblable au collagène de référence (sigma) ,et l'électrophorèse SDS-PAGE qui a montré des bandes de collagène II similaire au collagène de référence (sigma). Ces analyses ont prouvé que le CII est pur et efficace (activité biologique).

Le CII a été administré aux rats pour tester son activité biologique, après 20 jours de la 1^{ère} immunisation 90% des rats ont montré des signes de l'arthrite semblables à l'arthrite rhumatoïde de l'être humain, ce qui prouve que le CII est arthrogène

Le traitement de l'arthrite par l'extrait éthanolique de Marrubie avec une concentration de 150mg /kg, a montré un abaissement des signes de l'arthrite (score de l'arthrite et NGB) ce qui confirme que la plante Marrubie a un effet anti-arthritique .

Les mots clés:

Les suppléments alimentaires ,collagène type II, l'adjuvant complet de Freund, adjuvant incomplet de Freund, l'arthrite rhumatoïde ,extrait éthanolique de Marrubie ,

الملخص

المكملات الغذائية هي مواد غذائية تسمح بالوقاية أو تعويض النقص في النظام الغذائي العادي. الكولاجين يعتبر مصدر مهم من المكملات الغذائية بسبب تأثيراته المفيدة على الصحة.

الكولاجين هو بروتين الذي يشكل أغلب أنسجة الجسم، من بين أنواع الكولاجين يوجد نوع واسع الانتشار والمعروف بالكولاجين النوع 2. هذا النوع من الكولاجين يتشكل من ألياف حيث هذه الأخيرة توفر مقاومة الشد لأنسجة الغضروف. يستخدم هذا الكولاجين في عدة مجالات منها صناعات المواد الصيدلانية و الغذائية و يستعمل أيضا في تصنيع بعض مستحضرات التجميل.

اعتمدنا في دراستنا على غضروف الدجاج الذي يعتبر مصدر مهم للكولاجين 2 ، حيث تم استخراج الكولاجين من غضروف الدجاج بمردود 0.36%

تم امتحان نقاوة الكولاجين بطريقتين:

- طريقة الطيف الامتصاصي: الطيف بين امتصاصا أقصى بـ 228 نانومتر و مشابهة للكولاجين المرجعي (سيغما). أما طريقة الاستشراد الكهربائي فقد بينت أشربة مشابهة للكولاجين المرجعي (سيغما). هذه التحاليل بينت أن الكولاجين 2 نقي و فعال (النشاط البيولوجي).

تم حقن الفئران بالنوع 2 من الكولاجين لاختبار نشاطه البيولوجي، وبعد 20 يوما من الحقن الأول أظهرت 90% من الفئران علامات التهاب المفاصل يشبه التهاب المفاصل الروماتويدي عند الانسان. و هذا يثبت أن النوع 2 من الكولاجين مسبب للروماتيزم.

علاج التهاب المفاصل بمستخلص الايثانول من نبتة المريوث بتركيز 150مغ/كغ, يظهر انخفاض علامات الالتهاب (نسبة التهاب المفاصل, نسبة الكريات الدموية البيضاء) مما يثبت تأثير النبتة في مكافحة التهاب المفاصل.

الكلمات المفتاحية:

المكملات الغذائية، الكولاجين النوع 2 ، التهاب المفاصل الروماتويدي ، مستخلص الايثانول من نبتة المريوث.

Résumé

Les suppléments alimentaires sont des denrées alimentaires dont ils permettent de prévenir ou de compenser les carences dans un régime alimentaire normal. Le collagène est représenté une source intéressante du complément alimentaire à cause de ces effets bénéfiques sur la santé. Le collagène est une protéine qui constitue la majorité des tissus de l'organisme, parmi les type de collagène on trouve un type largement répandu, il s'agit du collagène type II (CII).

Le CII fait former des fibrilles, ce réseau fibrillaire fournit la résistance à la traction du tissu cartilagineux. Il est largement utilisé dans les produits alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Dans notre étude, on a purifié le CII à partir du sternal cartilage du poulet qui est également une bonne source du CII ,avec un rendement de 0.36%. La pureté de collagène purifié a été testé par deux méthodes : Une analyse spectroscopique : le spectre d'absorbance en UV-Visible a montré une absorbance maximale de collagène à 228 nm qui était semblable au collagène de référence (sigma) ,et l'électrophorèse SDS-PAGE qui a montré des bandes de collagène II similaire au collagène de référence (sigma). Ces analyse ont prouvé que le CII est pure et efficace (activité biologique).

Le CII a été administré aux rats pour tester son activité biologique, après 20 jours de la 1^{ère} immunisation 90% des rats ont montré des signes de l'arthrite sembles à l'arthrite rhumatoïde de l'être humain, se qui prouve que le CII est arthriogène .Le traitement de l'arthrite par l'extrait éthanolique de Marrubie avec une concentration de 150mg /kg, a montré un abaissement des signes l'arthrite (score de l'arthrite et NGB) se qui confirme que la plante Marrubie a un effet anti-arthritique .

Les mots clés: Les supplément alimentaires ,collagène type II, l'adjuvant complet de Freund, adjuvant incomplet de frend, l'arthrite rhumatoïde ,extrait éthanolique de Marrubie .

المخلص

المكملات الغذائية هي مواد غذائية تسمح بالوقاية أو تعويض النقص في النظام الغذائي العادي. الكولاجين يعتبر مصدر مهم من المكملات الغذائية بسبب تأثيراته المفيدة على الصحة.

الكولاجين هو بروتين الذي يشكل أغلب أنسجة الجسم، من بين أنواع الكولاجين يوجد نوع واسع الانتشار و المعروف بالكولاجين النوع 2. هذا النوع من الكولاجين يتشكل من ألياف حيث هذه الأخيرة توفر مقاومة الشد لأنسجة العضروف. يستخدم هذا الكولاجين في عدة مجالات منها صناعات المواد الصيدلانية و الغذائية و يستعمل أيضا في تصنيع بعض مستحضرات التجميل. اعتمدنا في دراستنا على عضروف الدجاج الذي يعتبر مصدر مهم للكولاجين 2 ، حيث تم استخراج الكولاجين من عضروف الدجاج بمرودود 0.36%

تم امتحان نقاوة الكولاجين بطريقتين:

- طريقة الطيف الامتصاصي: الطيف بين امتصاصا أقصى بـ 228 نانومتر و مشابهة للكولاجين المرجعي (سيغما). أما طريقة الاستشراد الكهربائي فقد بين أشرطة مشابهة للكولاجين المرجعي (سيغما). هذه التحاليل بينت أن الكولاجين 2 نقي و فعال (النشاط البيولوجي) تم حقن الفئران بالنوع 2 من الكولاجين لاختبار نشاطه البيولوجي، و بعد 20 يوما من الحقن الأول أظهرت 90 % من الفئران علامات التهاب المفاصل يشبه التهاب المفاصل الروماتويدي عند الانسان. و هذا يثبت أن النوع 2 من الكولاجين مسبب للروماتيزم. علاج التهاب المفاصل بمستخلص الايثانول من نبتة المريوث بتركيز 150مغ/كغ. يظهر انخفاض علامات الالتهاب (نسبة التهاب المفاصل, نسبة الكريات الدموية البيضاء) مما يثبت تأثير النبتة في مكافحة التهاب المفاصل.

الكلمات المفتاحية: المكملات الغذائية، الكولاجين النوع 2 ، التهاب المفاصل الروماتويدي ، مستخلص الايثانول من نبتة المريوث.