



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arréridj
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la
Terre et de l'Univers
Département des Sciences Biologiques
Laboratoire Caractérisation et Valorisation des Ressources Naturelles



Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat
Domaine S.N.V
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie

INTITULE

**Evaluation de l'activité antiarthritique et
toxique des extraits de *Péganum harmala* L.**

Présentée par :

DEHIRI Mounira

Soutenu le 23/02/2023

Devant le Jury :

Président	BOUBELLOUTA Tahar	MCA	Université de Bordj Bou Arréridj
Directeur de thèse	DIAFAT Abdelouahab	MCA	Université de Bordj Bou Arréridj
Co-directeur de thèse	FATMI Widad	MCB	Université de Bordj Bou Arréridj
Examineur 1	ARRAR Lekhmici	Professeur	Université de Sétif 1
Examineur 2	SELLAL Abd Hakim	MCA	Université de Sétif 1
Examineur 3	GUERGOUR Hassina	MCA	Université de Bordj Bou Arréridj
Invité	BENOUADAH Ali	Professeur	Université d'Alger 1

Année Universitaire 2022/2023

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

I. Publications

Dehiri M, Diafat A, Fatmi W, Ben Mansour R, Bouaziz F, Bahloul A. 2022. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities of *Peganum harmala* L. extracts. *Bbiotechnologia Acta*. 15(1): 1-11.

Dehiri M, Diafat A, Fatmi W, Bouaziz F, Rebai K, Bahloul A. 2022. Toxicity evaluation of Algerian *Peganum harmala* seed hydromethanolic extract. *Toxicology and Environmental Health Sciences*. 149(9): 351-359.

II. Communications

Dehiri M, Diafat A, Meribai A, Bahloul A. Activités antioxydante et antimicrobienne d'une plante médicinale *Péganum harmala*. La Première Journée Scientifique sur les Biotechnologies (1-JSB 18). 16 Avril 2018, M'sila, Algérie.

Dehiri M, Diafat A, Fatmi W. Biological activities of extracts of medicinal plant *Peganum harmala*. The organizers of the 18th International Days of Biotechnology (IDB2019) certify. 18-21 December 2019, Sousse, Tunisia.

Dehiri M, Diafat A, Fatmi W. Optimisation des conditions d'extraction (temps) des polyphénols et des flavonoïdes et l'effet antioxydant et anti-inflammatoire des extraits de la plante de *Peganum harmala*. Séminaire National sur la Biodiversité Végétale et Animale, Environnement et Santé. 20 Mai 2021, Mila, Algérie.

Dehiri M, Diafat A, Fatmi W. Effet de température sur l'activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante *Peganum harmala* L. International Seminaire on Biodiversity, Valorization and Conservation of Urban and Forest Ecosystems. 28-29 Avril 2021, M'Sila, Algérie.

DEDICACE

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات

Je dédie ce travail à **Ma Mère**, la prunelle de mes yeux, qu'elle trouve ici ma plus profonde gratitude et tout mon amour pour sa patience et son soutien et surtout pour ses prières pour moi tout au long de mes études.

A **Mon Père** pour m'avoir donné la vie et la joie de vivre. Vos conseils et bénédictions n'ont jamais fait défaut.

A mon cher **Mari** qui a su m'épauler, me pousser dans mes choix, et qui m'encourage toujours à aller plus loin, quoique cela nous coûte. Ta patience m'a toujours égayé même dans les moments les plus durs. Sans toi je ne serai pas arrivée jusque là.

A ma très chère fille, **Melissa Farah** qui m'a porté bonheur.

A mes sœurs et à mon frère pour leur soutien permanent
A toute ma famille, surtout **mes nièces** : Jana, Lina, Amir, Iyad et Adam.

A mes collègues et mes amies les doctorantes pour les sympathiques moments qu'on a passé ensemble : **HACHEMI Rania, SAKHRAOUI Amira, BOUBRIK Fairouz, BELABED Imen, ALIANE Wahiba, CHADI Sara et DEHAMNA Wassima.**

A tous ceux que j'aime.

Mounira

Remerciements

Avant tout, je remercie **Allah**, le Tout PUISSANT, le Miséricordieux, de m'avoir donné la force, le courage, et la santé afin de réaliser ce travail.

Je tiens à remercier **Dr. BOUBALLOUTA Tahar** docteur à l'université Mohamed El Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arréridj, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

J'exprime mes profonds remerciements à **Dr. DIAFAT Abdelouahab** docteur à l'université Mohamed El Bachir El Ibrahimi Bordj Bou Arréridj, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de recherche. Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté, pour votre encadrement, pour vos conseils, pour votre patience. Je vous remercie également pour les nombreuses relectures et corrections apportées à mes essais de rédaction.

J'exprime ma profonde gratitude à **Dr. FATMI Widad**, mon co-encadreur, pour sa disponibilité tout au long de ce travail pour m'avoir guidé dans ce travail, pour ses conseils, ses orientations, et sa patience.

Je remercie également les membres de jury de ma thèse ; **Pr. ARRAR Lekhmici**, **Dr. SELLAL Abd Hakim**, **Dr. GUERGOUR Hassina**, **Pr. BENOUDAH Ali** pour le temps qu'ils auront dédié à mon travail.

Je remercie **Dr. BENBACHA Faycel**, **Dr. GHOURIEB Ismail** et **Dr. TAIBI Sihem** pour leur aide précieuse dans la réalisation et l'interprétation des coupes histologiques.

Je tiens à remercier sincèrement **DERRAJI Yacine**, **BAALI Faiza**, **RIGHI Nadjat**, **DEGHIMA Amirouche** et **REBI Khalil** pour leurs aides, leurs disponibilités, leurs contributions lors de la réalisation de ce travail.

Que toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce travail, trouve ici l'expression de mes très vifs remerciements.

ملخص

نبات الحرمل (*Peganum harmala* L.) يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي الجزائري. الهدف من العمل الحالي هو تقييم بعض الأنشطة البيولوجية لفصيلة الحرمل، خاصة تأثيرها المضاد للالتهابات و المضاد لالتهاب المفاصل وتم كذلك تقييم سميتها. كان مردود عملية الاستخلاص الهيروميثانولي (EHm) أعلى مردود ($24.88 \pm 0.74\%$). أظهر التحليل الكيميائي النباتي أن EHm يحتوي على أعلى مستويات من البوليفينول (114.14 ± 0.90 ميكروغرام / مغ)، من الفلافونويد (31.20 ± 1.46 ميكروغرام EqQ / مغ) ومن الفلافونول (95.40 ± 0.80 ميكروغرام EqQ / مغ). في اختبار السمية الحادة، لم يلاحظ أي تغيير في السلوك ولم يلاحظ أي وفيات في الفئران المعالجة بـ EHm (بجرعات > 300 مغ / كغ من وزن الجسم) وقدرت الجرعة المميتة 50 (LD₅₀) بـ 501.47 مغ / كغ من وزن الجسم. زيادة معتبرة في نشاط إنزيم الكبد (ALAT و ALP) وفي مستويات اليوريا والكرياتينين في نموذج السمية الحادة. من ناحية أخرى، في دراسة السمية المزمنة لوحظ انخفاض في مستوى الكرياتينين. أثناء تناول EHm عن طريق الفم بصفة متكررة، لوحظ انخفاض في عدد الصفائح الدموية وأظهر الفحص النسيجي للكبد ارتشاح الكريات البيضاء واحتقان الأوعية الدموية. أظهرت اختبارات مضادات الأكسدة في المختبر أن EHm له أفضل تأثير ضد جذرال DPPH^{•+} و ABTS^{•+} بتركيز مثبط يقارب IC₅₀ بمقدار 2.03 ± 52.41 ميكروغرام / مل و 1.48 ± 0.01 ميكرو مول غ⁻¹ CAET، على التوالي. أظهرت نتيجة التبييض β-كاروتين / حمض اللينوليك أن EHm يثبط أكسدة البيتا كاروتين ($76.18 \pm 0.21\%$). بالإضافة إلى ذلك، أظهر هذا الأخير أفضل قوة لخفض الحديد. إضافة إلى ذلك، أظهر EHe نشاطاً أفضل لاستخلاص الحديد (31.0 ± 184.3 ميكروغرام / مل). أظهرت الدراسة المختبرية للنشاط المضاد للأكسدة أن EHm يحسن قدرة مضادات الأكسدة في البلازما وحالة الأكسدة الكبدية. يثبط مستخلص EHm و EHe بشدة تكاثر خلايا Hella بنسبة $99.77 \pm 0.15\%$ و $97.99 \pm 0.85\%$ على التوالي. أظهرت نتائج النشاط المضاد للالتهابات أن EHm يثبط تفكيك BSA ($80.61 \pm 0.84\%$). علاوة على ذلك، كان له أيضاً تأثير جيد كمضاد للالتهابات في نموذج وذمة الأذن التي يسببها الاكزيلان ($86.75 \pm 1.19\%$). إن EHm لفصيلة الحرمل قادر على تثبيط تطور التهاب المفاصل. كخاتمة نستنتج أن نبات الحرمل يمكن أن يكون مصدراً محتملاً للمركبات النشطة بيولوجياً ذات نشاط قوي مضاد للأكسدة ومضاد للميكروبات ومضاد للتكاثر. يعتبر EHm ساماً بشكل معتدل عند تناوله بشكل حاد ويمكن استخدام هذا المستخلص بأمان بجرعات تصل إلى 100 مجم / كجم. علاوة على ذلك، أظهرت الدراسة الحالية التأثير المضاد للالتهابات لـ EHm في العلاج الوقائي والعلاجي لالتهاب المفاصل الناجم عن الكولاجين. من المستحسن إجراء دراسات إضافية لهذا النبات في المختبر وفي الجسم الحي من أجل دمجها في صناعة الأدوية المضادة للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: *Peganum harmala* L، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للتكاثر، نشاط مضاد لالتهاب المفاصل، سمية حادة، سمية مزمنة.

Résumé

Peganum harmala L., est une plante très utilisée en médecine traditionnelle algérienne. L'objectif du présent travail est l'évaluation de certaines activités biologiques de *P. harmala*, particulièrement l'effet anti-inflammatoire, antiarthritique et la toxicité de cette plante. L'évaluation des rendements montre que l'extrait hydrométhanolique (EHm) présente le rendement le plus élevé (24.88 ± 0.74 %). L'analyse phytochimique a montré que l'EHm présente les teneurs les plus élevées en polyphénols (114.14 ± 0.90 μg EAG/mg), en flavonoïdes (31.20 ± 1.46 μg EqQ/mg) et en flavonol (95.40 ± 0.80 μg EqQ/mg). Dans le test de toxicité aiguë aucun changement de comportement et aucune mortalité n'a été observée chez les souris traitées par l'EHm (à des doses < 300 mg/kg Pc), et la DL_{50} a été estimée à 501.47 mg/kg Pc. Une augmentation significative de l'activité des enzymes hépatiques (ALAT et PAL) et de taux d'urée et de créatinine dans le modèle de toxicité aiguë. En revanche, dans l'étude de la toxicité chronique une diminution de taux de créatinine a été observée. Lors de l'administration orale répétée d'EHm, une diminution du nombre de plaquettes a été notée et l'examen histologique du foie a montré une infiltration leucocytaire et une congestion vasculaire. Les tests antioxydants *in vitro* ont révélés que l'EHm a le meilleur effet contre le radical DPPH• et d'ABTS⁺ avec un IC_{50} de 52.41 ± 2.03 $\mu\text{g/ml}$ et 1.48 ± 0.01 $\mu\text{mol g}^{-1}$ CAET, respectivement. Le résultat du blanchissement du β -carotène/acide linoléique a révélé que l'EHm inhibait le blanchiment du β -carotène (76.18 ± 0.21 %). De plus, ce dernier a présenté un meilleur pouvoir réducteur de fer. De plus l'EHE a présenté une meilleure activité de chélation du fer (184.3 ± 31.0 $\mu\text{g/ml}$). L'étude *in vitro* de l'activité antioxydante montre que l'EHm a amélioré la capacité antioxydante plasmatique et l'état redox hépatique. L'EHm et l'EHE ont fortement inhibé la prolifération des cellules *HeLa* de 99.77 ± 0.15 % et de 97.99 ± 0.85 %, respectivement. Les résultats de l'activité anti-inflammatoire ont montré que l'EHm inhibait la dénaturation de la BSA (80.61 ± 0.84 %). De plus, il avait également un bon effet anti-inflammatoire sur le modèle d'œdème de l'oreille induit par le xylène (86.75 ± 1.19 %). L'EHm de *P. harmala* capable d'inhiber le développement de l'arthrite. On conclut que la plante sélectionnée pourrait être une source potentielle de composés bioactifs à forte activité antioxydante et antiproliférative. L'EHm est modérément toxique lorsqu'il est administré de manière aiguë et cet extrait peut être utilisé en toute sécurité à des doses allant jusqu'à 100 mg/kg. De plus, la présente étude a démontré l'effet anti-inflammatoire de l'EHm dans le traitement préventif et curatif de l'arthrite induite par le collagène. Des études complémentaires de cette plante *in vitro* et *in vivo* sont souhaitables afin de l'intégrer dans la fabrication de médicaments anti-inflammatoires.

Mots clés : *Peganum harmala* L., activité antioxydante, activité antiproliférative, activité antiarthritique, toxicité aiguë, toxicité chronique.

Abstract

Peganum harmala L., is a plant widely used in traditional Algerian medicine. The objective of the present study is the evaluation of some biological activities of *P. harmala*; particularly the anti-inflammatory, antiarthritic effects and the toxicity of this plant. The evaluation of the yields shows that the hydromethanolic extract (EHm) presents the highest yield ($24.88 \pm 0.74\%$). The phytochemical analysis revealed that the HmE has the highest content of polyphenols (114.14 ± 0.90 g GAE/mg), flavonoids (31.20 ± 1.46 g QEqQ/mg), and flavonol (95.40 ± 0.80 g QEq/mg). In the acute toxicity test, no change in behavior and no mortality was observed in mice treated with HmE (at doses < 300 mg/kg BW), and the LD50 was estimated at 501.47 mg/kg BW. A significant increase in liver enzyme activity (ALAT and ALP) and in urea and creatinine levels in the acute toxicity model. On the other hand, in the chronic toxicity study a decrease in creatinine level was observed. During repeated oral administration of HmE, a decrease in the number of platelets was noted and histological examination of the liver showed leukocyte infiltration and vascular congestion. *In vitro* antioxidant tests revealed that the HmE has the best effect against DPPH• and ABTS⁺ radical with an IC₅₀ of 52.41 ± 2.03 µg/ml and 1.48 ± 0.01 mol g⁻¹ TEAC, respectively. The result of β-carotene/linoleic acid bleaching revealed that HmE inhibited β-carotene bleaching ($76.18 \pm 0.21\%$). Moreover, the latter presented a good iron reducing power. In addition, EHe showed better iron chelation activity (184.3 ± 31.0 µg/ml). The *in vitro* study of antioxidant activity shows that HmE improved plasma antioxidant capacity and hepatic redox state. HmE and HeE strongly inhibited *HeLa* cell proliferation by $99.77 \pm 0.15\%$ and $97.99 \pm 0.85\%$, respectively. The results of the anti-inflammatory activity showed that HmE inhibited the denaturation of BSA ($80.61 \pm 0.84\%$). Moreover, it also had a good anti-inflammatory effect on the xylene-induced ear edema model ($86.75 \pm 1.19\%$). The HmE from *P. harmala* able to inhibiting the development of arthritis. It is concluded that the selected plant could be a potential source of bioactive compounds with strong antioxidant and antiproliferative activity. HmE is moderately toxic in acute toxicity, and this extract can be used safely at doses up to 100 mg/kg. Moreover, the present study demonstrated the anti-inflammatory effect of HmE in the preventive and curative treatment of collagen-induced arthritis. Additional studies of this plant *in vitro* and *in vivo* are desirable in order to integrate it into the manufacture of anti-inflammatory drugs.

Key words: *Peganum harmala* L., antioxidant activity, antiproliferative activity, antiarthritic activity, acute toxicity, chronic toxicity.

Liste des abreviations

AA % : Pourcentage de l'activité antioxydante	GCA : Groupe contrôle arthritique
ABTS : 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid)	GCN : Groupe contrôle normal
AC : cartilage amélioré	GRf : Groupe de référence
ACF : Adjuvant complet de Freund	GSH : Glutathion réduit
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens	Hc : Hématocrite
ALAT : Alanine aminotransférase	HEV : Haute veine endothéliale
AR : Arthrite rhumatoïde	Hg : Hémoglobine
ASAT : Aspartate aminotransférase	HLA : Antigène leucocytaire humain
ATCC : American type culture collection	IC50 : Concentration inhibitrice
BD : os détruit	IF : infiltrat inflammatoire
BHA : Butylhydroxyanisole	IFN : Interféron
BHT : Butylhydroxytoluène	Ig (-A, -E, -M, -G) : Immunoglobuline
BMH : Bouillon Mueller Hinton	IL (-1, -4, -6, -10, -17) : Interleukine (-1, -4, -6, -10)
BR : remodelage osseux	ISM : membrane synoviale enflammée
BSA : Albumine de sérum bovin	KG : reins de groupe traités
CAET : Capacité Antioxydante équivalente de Trolox	KHCG : groupe contrôle histologie rénale
CAP : Capacité antioxydante plasmatique	KHTG : groupe test d'histologie rénale
CAT : Catalase	LCG : Foie de groupe contrôle
CCP : Péptide cyclique citruliné	LDL : Lipoprotéines de faible densité
CII : Collagène type II	LG : Foie d'animaux traités
COX-2 : cyclooxygénase-2	LHCG : Groupe contrôle histologie hépatique
CPA : Cellules présentatrices d'antigènes	LHTG : groupe de test d'histologie hépatique
Cur : curatif	MCP : Métacarpophalangiennes
CRP : Protéine C-réactive	MDA : Malondialdéhydes
CTLA-4 : Protéine associée aux lymphocytes T cytotoxiques 4	MIR : remodelage inflammatoire modéré
CV : Congestion vasculaire	MMPs (-1, -2, -3, -8, -9) : Matrix Métalloproteinases
DAMPs : Modèles moléculaires associés aux dommages	MO : moelle osseuse
DB : os détruit	MTT : Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
DC : cartilage détruit	MTX : Méthotrexate
DL₅₀ : Dose létal médiane	NF-κB : Facteur nucléaire kappa-B
DMARDs : Antirhumatismaux modificateurs	OMS : Organisation mondiale de santé
DMSO : Diméthylsulfoxyde	PAL : Phosphatase alcaline
DO : Densité optique	Pc : Poids corporel
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle	PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes
DS : Dilatation sinusoidale	PG : peptidoglycane

DTNB : Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque

EAA : Equivalent acide ascorbique

EAG : Equivalent acide gallique

EaQ : Extrait Aqueux

EC50 : Concentration effectrice

EDc : Extrait de décoction

EDTA : Ethylène diamine Tétracétique Acide

EGF : Facteur de croissance épidermique

EHe : Extrait hydro-éthanolique

EHm : Extrait hydro-méthanolique

EqQ : Equivalent quercetine

ERA : Espèce réactive d'azote

ERO : Espèce réactive d'Oxygène

Es : Extrait sec

Ext : Extrait

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes

FLS : Synoviocyte de type fibroblaste

FNS : Formule et numération sanguine

FR : Facteur Rhumatoïde

FT : tissu adipeux

PGE2 : prostaglandine E2

PLT : Plaquettes

PNN : Polynucléaires neutrophils

Po : Poids des organes

Pré : préventif

Pr : Poids relative

RANK : Récepteur Activateur du Facteur Nucléaire
Kb

RANKL : Activateur du récepteur du ligand du
facteur nucléaire Kappa B

ROS : Les espèces réactives de l'oxygène

SIC : légères modifications inflammatoires

SIF : fibrose inflammatoire sévère

TBA : Acide thiobarbiturique

TCA : Acide trichloroacetic

TCR : Récepteur des lymphocytes T

Th (-1, -2, -17): T helper (-1, -2, -17)

TLR: Toll like Receptor

TNB: L'acide 5-thio-2- nitrobenzoïque

TNF α : Facteur de nécrose tumorale α

VCAM : Molécule d'adhésion des cellules
vasculaires

VS : Vitesse de Sédimentation

Liste des figures

Figure 1 : Schéma comparatif d'une articulation normale (A) et d'une articulation arthritique (B) au stade symptomatique.....	5
Figure 2 : Volumineuse ténosynovite des extenseurs avec luxation de la tête cubitale.....	12
Figure 3 : Déformations caractéristiques des mains au cours de l'AR.	12
Figure 4 : Nodules rhumatoïdes au niveau de l'avant-bras (A), au niveau de la poignée et les doigts (B) et au niveau du coude (C).....	14
Figure 5 : Différentes phases de la physiopathologie de l'arthrite rhumatoïde.....	16
Figure 6 : Les différentes parties du plant de <i>Peganum harmala</i> L.	27
Figure 7 : Structure générale des quinazolines de <i>P. harmala</i> L.....	29
Figure 8 : Les fruits et les graines de la plante <i>Peganum harmala</i> L.....	38
Figure 9 : Courbe dose-mortalité pour l'Ehm de <i>P. harmala</i> chez les souris (doses orales uniques).....	57
Figure 10 : Poids corporel des souris de groupe contrôle et les souris des groupes traitées par voie orale avec l'Ehm de <i>P. harmala</i> L.....	59
Figure 11 : Poids relatif des organes des souris traitées avec l'Ehm de <i>P. harmala</i> et les souris de groupe contrôle.....	59
Figure 12 : Coupes histopathologique du foie et des reins des souris contrôle et des souris traités avec l'Ehm de <i>P. harmala</i> L. en toxicité aiguë (x 40).....	61
Figure 13 : L'effet de l'administration orale chronique d'extrait de <i>P. harmala</i> L. sur le poids corporel des rats.....	62
Figure 14 : Paramètres biochimiques des groupes contrôle et traités avec l'Ehm de <i>P. harmala</i>	65
Figure 15 : Coupes histologiques rénales des animaux traités et du groupe contrôle (x 40).....	67
Figure 16 : Coupe histologique hépatique des animaux traités et groupe contrôle (x 40).....	67
Figure 17 : Les concentrations des extraits de <i>P. harmala</i> et BHT qui inhibent 50 % du radical DPPH.....	69
Figure 18 : Pouvoir réducteur des extraits de <i>P. harmala</i> L. et BHA.....	70
Figure 19 : EC ₅₀ des extraits de <i>P. harmala</i> et de BHA.	71
Figure 20. Cinétique de blanchiment au β -carotène en présence des extraits de <i>P. harmala</i> , eau, méthanol et BHT pendant 48 h.	72
Figure 21 : La capacité antioxydante totale des extraits de <i>P. harmala</i> L. et le BHT.....	73
Figure 22 : Activité antioxydante plasmatique des rats traités par l'Ehm de <i>P. harmala</i> , par l'acide ascorbique et par le DMSO 4% contre le radicale DPPH	74
Figure 23 : La capacité de réduction ferrique des rats traités par différentes doses de l'Ehm	

de <i>P. harmala</i> , par la vitamine C et par le DMSO 4 % (contrôle).	75
Figure 24 : Pourcentage d'inhibition de la viabilité de la lignée cellulaire <i>HeLa</i> par les extraits de <i>P. harmala</i> L.....	78
Figure 25 : Effet anti-inflammatoire <i>in vitro</i> des extraits de <i>P. harmala</i> et de Diclofénac.....	81
Figure 26 : Pourcentage d'inhibition de l'œdème par les extraits de <i>P. harmala</i> et le diclofénac.....	82
Figure 27 : L'effet de l'HmE de <i>P. harmala</i> sur les cellules immunitaires.....	86
Figure 28 : Evolution des signes cliniques (score arthritique) chez les rats, groupes préventifs traités avec des doses de 50 et 100 mg de l'EHm de <i>P. harmala</i> /kg PC ; (n = 8).....	88
Figure 29 : Evolution des signes cliniques d'arthrite observés après 21 j d'induction de l'arthrite au CII.	89
Figure 30 : Les niveaux de la protéine C réactive dans le sérum des rats des groupes curatifs traités avec les doses de 50 et 100 mg de l'EHm /kg.....	91
Figure 31 : L'effet de l'EHm sur les cellules immunitaires dans le sang des groupes traités avec les doses de 50 et 100 mg/kg.....	93
Figure 38 : Evolution de score arthritique chez les rats des groupes curatifs traités avec 50 et 100 mg de l'EHm de <i>P. harmala</i> /kg, de GCA (groupe contrôle arthritique), de GCN (groupe contrôle normal) et de GRf (groupe de référence)	94
Figure 33 : Vitesse de sédimentation des groupes traités avec des doses de 50 et 100 mg de l'EHm/kg, GCA (groupe contrôle arthritique), GCN (groupe contrôle normal) et le GRf (groupe de référence)	94
Figure 34 : Coupes histologiques des articulations des rats arthritiques, normaux et traitées avec l'EHm de <i>P. harmala</i> L. X 40.	96

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les doses toxiques des alcaloïdes β -carbolines sur différentes espèces.....	30
Tableau 2 : Les Substances volatiles rencontrées chez <i>P. harmala</i> L.....	31
Tableau 3 : Échelle de la classification des substances toxiques chez les rongeurs selon Hodge et Sterner.....	36
Tableau 4 : Poids relatif des organes des rats contrôle et des rats traités.....	63
Tableau 5 : Effet de l'EHm de <i>P. harmala</i> (100, 200 et 300 mg/kg PC) sur les paramètres hématologiques chez des rats Wistar femelles traités pendant 90 jours.....	64
Tableau 6 : L'activité de Catalase (μ mole/min/mg de protéine), taux de GSH (nmole/g de tissu) et taux de MDA (nmole/g de tissu) dans le foie des rats.	77
Tableau 7 : Effet de l'EHm de <i>P. harmala</i> sur le poids des rats arthritiques.....	83
Tableau 8 : Effet de l'EHm de <i>P. harmala</i> sur la formule et la numération sanguine dans l'étude préventive	85
Tableau 9 : Effet de l'EHm de <i>P. harmala</i> sur le poids des rats arthritiques.....	90
Tableau 10 : Effet de l'EHm de <i>P. harmala</i> sur la formule et la numération sanguine.....	92

Table des matières

Dédicace	
Remerciements	
ملخص	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Les maladies inflammatoire (s)

1. Les maladies inflammatoire (s).....	3
1.1. Inflammation.....	3
1.1.1. Définition.....	3
1.1.2. Types de l'inflammation.....	3
1.1.3. Pathologies inflammatoires.....	4
1.2. L'arthrite rhumatoïde.....	4
1.2.1. Structure de l'articulation.....	4
1.2.2. Définition de l'arthrite rhumatoïde.....	5
1.2.3. Données épidémiologiques.....	6
1.2.4. Étiologie de l'arthrite rhumatoïde.....	6
1.2.5. Diagnostic de l'arthrite rhumatoïde.....	10
1.2.6. Physiopathologie de l'arthrite rhumatoïde.....	15
1.2.7. Stratégie thérapeutique dans le traitement de l'AR.....	19

Chapitre 2 : Stress oxydant

2. Stress oxydant.....	24
2.1. Définition.....	24
2.2. Espèces réactives de l'oxygène.....	24
2.3. Rôle des ERO dans la physiopathologie de l'AR.....	24
2.5. Les antioxydants.....	25

Chapitre 3 : Présentation de la plante *Peganum harmala* L.

3.1. Description botanique.....	28
3.2. La classification botanique.....	28
3.3. Nomenclature et appellation.....	28
3.4. Répartition géographique.....	28
3.5. Etudes phytochimiques.....	28
3.6. Utilisation traditionnelle.....	32
3.7. Activités pharmacologiques de <i>Peganum harmala</i> L.....	33
3.7.1. Effets cardiovasculaires.....	33
3.7.2. Effets sur le système nerveux.....	33
3.7.3. Effet cytotoxique.....	33
3.7.4. Effets antibactérien, antifongique, insecticide et antiparasitaire.....	33
3.7.5. Effets anticancéreux	34
3.7.6. Effet hypothermique.....	34
3.7.7. Effets antidiabétiques.....	34
3.8. Données toxicologiques de la plante.....	34
3.8.1. Circonstance(s) de l'intoxication.....	35
3.8.2. Évaluation de l'innocuité de <i>P. harmala</i> L.....	35

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et méthodes

1. Matériel.....	38
1.1. Matériel végétal.....	38
1.2. Matériel Animal.....	38
2. Méthodes.....	39
2.1. Extraction des composés phénoliques.....	39
2.1.1. Préparation d'extrait hydrométhanolique (EHm).....	39
2.1.2. Préparation d'extrait aqueux (EAq).....	39
2.1.3. Préparation d'extrait hydroéthanolique (EHe).....	39
2.1.4. Préparation d'extrait de décoction (EDc).....	39
2.2. Estimation spectrophotométrique des composés phénoliques.....	39
2.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	39
2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux.....	40
2.2.3. Dosage des flavonols.....	40

2.3. Étude de la toxicité de <i>Péganum harmala</i>	40
2.3.1. Toxicité aiguë.....	40
2.3.2. Étude de la toxicité chronique	42
2.4. Etude de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	43
2.4.1. Activités antiradicalaires.....	43
2.4.2. Pouvoir réducteur ferrique.....	44
2.4.3. Test de blanchissement de β -carotène.....	44
2.4.4. Capacité antioxydante totale	45
2.4.5. Chélation du fer ferreux.....	46
2.5. L'activité antioxydante <i>in vivo</i>	46
2.6. Étude de l'activité antiproliférative.....	49
2.6.1. Lignées cellulaires et conditions de culture.....	49
2.6.2. Test au bleu de trypan «Comptage des cellules».....	49
2.6.3. Teste de MTT.....	50
2.7. Activité anti-inflammatoire.....	50
2.7.1. Évaluation de l'effet anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	50
2.7.2. Évaluation de l'effet anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	51
2.8. Activité antiarthritique de l'Ehm	51
2.8.1. Induction de l'arthrite par le collagène type II chez les rats.....	51
2.8.2. Traitement préventif et curatif des rats arthritiques par l'Ehm.....	51
2.8.3. Évaluation du développement de l'arthrite.....	52
2.8.4. Les coupes histologiques.....	53
2.9. Analyse statistiques	56

Chapitre 2 : Résultats et discussion

3.1. Analyse quantitative des composés phytochimiques.....	55
3.1.1. Rendement d'extraction.....	57
3.1.2. Teneur en composée phénolique.....	55
3.2. Etude toxicologique.....	56
3.2.1. Toxicité aiguë.....	56
3.2.2. Toxicité chronique.....	61
3.3. Activité antioxydante <i>in vitro</i>	68
3.3.1. Activités antiradicalaires	68
3.3.2. Pouvoir réducteur	70

3.3.3. Test de β -carotène.....	71
3.3.4. Capacité antioxydante totale	73
3.3.5. Pouvoir de chélation de fer.....	73
3.4. Activité antioxydante <i>in vivo</i>	74
3.4.1. Capacité antioxydante plasmatique	74
3.4.2. Etat de redox hépatique.....	76
3.5. Effet antiprolifératif	78
3.6. Effet anti-inflammatoire	80
3.6.1. Effet anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	80
3.6.2. Effet anti-inflammatoire <i>in vivo</i>	81
3.7. Effet antiarthritique de l'Ehm.....	83
3.7.1. Étude préventive.....	83
3.7.2. Etude curative.....	90
Conclusion et perspectives.....	97
Références bibliographiques.....	99
Annexe	

INTRODUCTION

Introduction

L'arthrite rhumatoïde (AR) est une maladie auto-immune chronique d'origine inconnue qui se manifeste par des atteintes articulaires et extra-articulaires pouvant évoluer vers une destruction du cartilage et de l'os, invalidant le malade et menaçant sa vie (Singhai et Patil, 2021). La prévalence mondiale de l'AR varie entre 0.4 et 1.2 % (Khaldoun *et al.*, 2020), alors que leur prévalence en Algérie estimée à 0.15 % de la population adulte (Slimani et Ladjouze-Rezig, 2014). Elle survient plus fréquemment chez les femmes que chez les hommes, elle est principalement observée chez les personnes âgées. Ces complications sont survenues tout au long de l'apparition de la maladie et de sa progression et sont principalement liées à une inflammation excessive (Ramadan et El-Menshawey, 2013).

De nos jours, les stratégies thérapeutiques actuelles dans l'AR reposent sur l'utilisation des médicaments pour le traitement des affections inflammatoires qui implique l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), d'anti-rhumatismaux modificateurs de la maladie (DMARD) et les corticostéroïdes (Lin *et al.*, 2020). Cette approche conventionnelle a montré des résultats efficaces avec une amélioration des symptômes mais elles prennent de plus en plus une image défavorable par l'apparition de sérieux effets secondaires souvent indésirables et par leur efficacité parfois insuffisante (Luo *et al.*, 2014).

Un déséquilibre entre la production d'espèces réactives et leur élimination par les mécanismes de protection, peut conduire à une inflammation chronique et vice versa. Les effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des espèces azotées (RNS) comme les radicaux libres sur l'articulation synoviale et les organes vitaux sont également évidents et ont un rôle potentiel dans le développement de l'AR (Pincus et Cutolo, 2015).

En s'appuyant sur cette vision, pour remédier aux problèmes des effets indésirables des molécules synthétiques, lutter contre le stress oxydant et principalement pour soulager des troubles liés aux maladies rhumatismales, il devient indispensable d'intensifier l'effort de recherche pour développer de nouveaux médicaments en utilisant la phytothérapie, qui est la plus grande réserve de substances actives avec des activités pharmacologiques plus larges. En effet, les produits naturels en général et les plantes médicinales en particulier sont des sources importantes de nouveaux composés actifs susceptibles de devenir des molécules clés dans de nouvelles préparations médicaux (Dall'Acqua, 2014).

L'Algérie possède un ensemble considérable d'espèces naturelles de très grande importance, ces ressources méritent donc d'être valorisées. *Peganum harmala* L. communément appelé « harmal » de la famille des Zygophyllaceae, est une plante herbacée vivace poussant dans la région semi-aride. Ses différentes parties ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement des maladies rhumatismales, elle possède également des propriétés anticancéreuses, antiparasitaires, vasorelaxantes (**Berrougui et al., 2006 ; Jalali et al., 2021**), antinociceptives et antitumorales (**Moghadam et al., 2010 ; Zhang et al., 2021**).

L'utilisation des plantes et beaucoup plus les plantes medicinale présente des effets indésirables et toxiques surtout a des doses élevés. Les intoxications aiguës par les plantes continuent d'être un important problème de santé dans beaucoup de pays développés et en voie de développement (**Rkain et al., 2011**). Elles constituent une cause fréquente d'admission aux services des urgences et de réanimation (**Mégarbane et Baud, 2006**). En Algérie, elles constituent un sérieux problème de santé public et une préoccupation inquiétante parce qu'elles touchent toutes les tranches d'âge (**Mahdeb et al., 2013**).

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de *Peganum harmala* L. principalement leur effet anti-inflammatoire, pour atteindre cet objectif on a prouvé :

- L'évaluation de la toxicité et de quelque activité biologique de *Peganum harmala*,
- Prouver l'effet anti-inflammatoire des extraits de *Peganum harmala* sur un modèle animal,
- Le traitement préventif et curatif de l'arthrite par l'extrait hydrométhanolique de *Peganum harmala* L.

Cette étude subdivise en deux parties essentielles, la première partie présente une synthèse bibliographique, qui englobe trois principaux chapitre (les maladies inflammatoires, la relation entre le stress oxydant et l'arthrite rhumatoïde et l'étude de la plante *Peganum harmala* L). La deuxième partie, expérimentale, décrit le matériel et les méthodes utilisés pour l'évaluation de la sécurité de *P. harmala* et l'étude de l'activité antioxydante (*in vitro* et *in vivo*) et antiproliférative *in vitro* des extraits de l'espèce étudiée. L'effet antiarthritique de l'extrait hydrométhanolique de *P. harmala* L. a été évalué à l'aide d'un modèle animal d'arthrite induite par le collagène II chez le rat. Puis nous avons exposé l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion et enfin, nous finirons par une conclusion et perspectives.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les maladies inflammatoires

1.1. Inflammation

1.1.1. Définition

La réaction inflammatoire est un processus physiologique de défense immunitaire de l'hôte en réponse à une agression d'origine physique, chimique ou biologique qui entraîne une altération tissulaire (**Adda et al., 2020**). Elle a pour objet d'éliminer l'agent pathogène, réparer les lésions tissulaires, favoriser le retour à l'homéostasie et la cicatrisation du tissu lésé (**Rahman et al., 2022**). C'est un ensemble de phénomènes réactionnels se produisant au point irrité par un agent pathogène. Elle se traduit ordinairement par quatre symptômes cardinaux : œdème, douleur, chaleur et érythème. Au niveau tissulaire, la réponse inflammatoire se caractérise par l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'augmentation de la dénaturation de protéines et l'altération de la membrane cellulaire (**Kanso et al., 2021**).

1.1.2. Type d'inflammation

➤ Inflammation aiguë

Il s'agit de la réponse immédiate de l'organisme à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours à quelques semaines) et d'installation souvent brutale (**Serhan et al., 2020**). Elle est caractérisée par une forte présence des polymorpho-nucléaires au niveau du foyer inflammatoire et par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses (**Rathinam et Fitzgerald, 2016**). Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante (**Kanso et al., 2021**). Quelle que soit son siège et la nature de l'agent pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs qui peuvent être résumé en trois phases : phase vasculaire (réaction vasculo-exsudative), la phase cellulaire et la phase de régénération (**Dorward et al., 2012**).

➤ Inflammation chronique

La persistance de la réaction inflammatoire de l'immunité innée et acquise et la perturbation de son contrôle physiologique conduisent à la chronicité de l'inflammation (plusieurs mois ou années) comme dans l'arthrite rhumatoïde, rejet de l'allogreffe chronique, dans la bérylliose et dans l'inflammation granulomateuse (**Serhan et al., 2010**). En effet, une infiltration excessive des leucocytes au niveau du site inflammatoire et une

mauvaise élimination de l'agent causal de l'inflammation sont à l'origine du développement de l'inflammation chronique (**Park et al., 2014**).

1.1.3. Pathologies inflammatoires

L'inflammation provoque le développement de plusieurs maladies humaines telles que le cancer, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose, les maladies pulmonaires, l'asthme, la polyarthrite rhumatoïde, l'ostéoporose, les maladies neuro-dégénératives, la maladie d'Alzheimer, et les maladies intestinales inflammatoires (**Christine et Oehler, 2020 ; Haroon et al., 2020 ; Spel et Martinon, 2020; Roxanna et al., 2020; Hu et al., 2020; Dabravolski et al., 2021**).

1.2. L'arthrite rhumatoïde

1.2.1. Structure de l'articulation

L'articulation est une entité aux composants interdépendants. Elle assemble au moins deux extrémités osseuses (**Dumontet et Bigot-Corbe, 2012**). Lorsqu'elle est saine, elle est composée de deux os recouverts de cartilage (constitué par un seul type de cellules nommées les chondrocytes) et délimitée par la capsule articulaire elle-même tapissée par la membrane synoviale (contient au moins deux types de cellules : les cellules de type macrophage et les cellules de type fibroblastes) (**Sardella, 2010**). Des ligaments et des muscles entourent l'articulation, pour la maintenir et la rendre mobile (**SFR, 2006**) (**figure 1**).

En cas d'inflammation de la membrane synoviale, la production de l'acide hyaluronique sera augmentée sous l'action des molécules pro-inflammatoires (**Damiano et Bardin, 2004**). D'autre part, l'inflammation articulaire augmente la perméabilité vasculaire synoviale permettant donc le passage des protéines du sang vers le liquide synoviale (**Damiano et Bardin, 2004**).

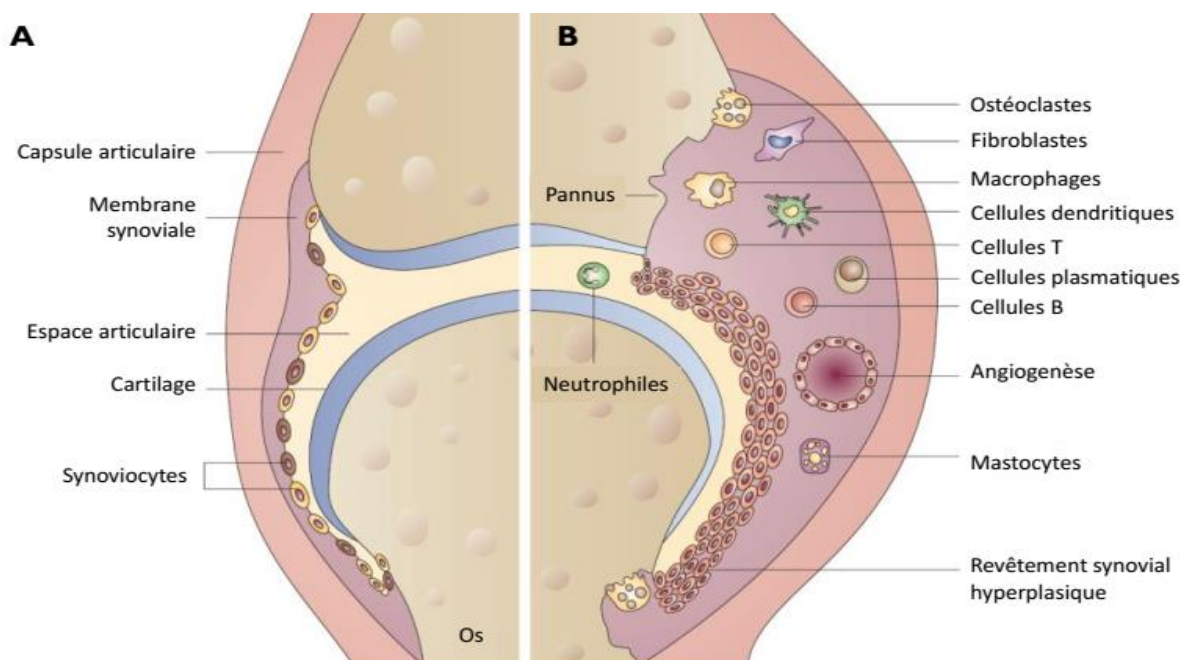


Figure 1. Schéma comparatif d'une articulation normale (A) et d'une articulation arthritique (B) au stade symptomatique (Delay, 2018).

1.2.2. Définition de l'arthrite rhumatoïde

Le terme «arthrite», du grec arthron : articulation ; désigne toutes les affections inflammatoires qui touchent les articulations de manière aiguë, c'est-à-dire d'apparition brutale et d'évolution rapide, ou au contraire de manière chronique (Delay, 2018). Lorsque plusieurs articulations sont impactées par l'inflammation, on parle alors de « polyarthrite » (Charpin, 2011). Le terme rhumatisme désigne les maladies touchant l'appareil locomoteur, c'est-à-dire les os, les articulations, les tendons ou encore les muscles. Quand le rhumatisme affecte précisément le cartilage ou la membrane synoviale, nous parlons alors d'une maladie articulaire ou arthropathie (ACR, 2002). L'AR fait partie du groupe des maladies auto-immunes en raison de nombreux signes d'auto-réactivité, avec la présence d'autoanticorps comme les facteurs rhumatoïdes et les anticorps anti-illagrine (Yeom *et al.*, 2006).

L'AR ne se limite pas à la destruction des articulations. Elle fait partie des maladies systémiques, véritable connectivité, entraînant des manifestations extra-articulaires car plusieurs organes en plus des articulations sont susceptibles d'être touchés (Avoac, 2017). En effet, des effets systémiques peuvent se manifester notamment la fatigue, la perte de poids et l'anémie. La cause principale de mortalité chez les atteints de l'AR provient des complications cardiovasculaires, infectieuses, hématologiques, gastro-intestinales et pulmonaires (Tobón *et al.*, 2010).

1.2.3. Données épidémiologiques

L'AR est une pathologie qui touche toutes les races où elle a été recherchée mais sa prévalence varie grandement selon l'origine géographique ou ethnique des populations étudiées (**Marc, 2012**). Les études épidémiologiques de l'AR sont difficiles à réaliser et donnent souvent des résultats divergents, principalement à cause de l'hétérogénéité de la maladie et surtout parce qu'elle ne présente pas toujours de marqueurs biologiques ou radiologiques spécifiques à son début (**Minichiello et al., 2017**).

L'AR existe dans le monde entier, d'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), sa prévalence est variée entre 0.4 et 1.3 % (**WHO, 2003**). En Afrique et en Asie, elle est classiquement estimée entre 0.1 et 0.3 % (**Guillemin et al., 2005**). En Algérie, l'AR est très endémique. Selon une enquête menée en Algérie du 14 février au 11 avril 2014 par Slimani et Ladjouze-Rezig, a recensé plus de 100.000 cas de polyarthrite rhumatoïde ; soit environ 0.15 % de la population (**Slimani et Ladjouze-Rezig, 2014**).

La prévalence est différente entre les pays d'un même continent. Une prévalence plus élevée a été observée dans les pays d'Europe du Nord par rapport aux pays du Sud (**Guillemin et al., 2005**). En outre, il a été démontré que la prévalence de l'AR variait au sein d'un pays, par exemple la prévalence de l'AR dans toute la Turquie était de 0.56 %, tandis que dans la région du nord, la prévalence était de 2.04 % contre 0 % dans la région du sud (**Tuncer et al., 2018**).

La pathologie est majoritairement fréquente dans les tranches d'âge de 35 à 55 ans, et elle est quatre fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes, mais cette différence diminue progressivement au-delà de 70 ans (**Dougados et al., 2005**). L'AR est 2 à 3 fois plus fréquente chez les parents de sujets atteints ; sa concordance chez les jumeaux monozygotes est de 15 à 30 % et, chez les jumeaux dizygotes de 5 à 10 % (**Benard, 2009**).

1.2.4. Étiologie de l'arthrite rhumatoïde

L'AR est, comme beaucoup de maladie auto-immune, une pathologie multifactorielle (**Helmes et al., 2006**). Il semblerait que le processus pathologique est la conséquence de plusieurs facteurs aussi bien environnementaux qu'intrinsèques du patient (facteurs génétiques, hormonaux, psychologiques...) (**Deane et al., 2017**). La transfusion sanguine est également considérée comme facteur de risque (**Ollier et al., 2001**).

a. Facteurs environnementaux

Les variations de prévalence de l'AR entre différentes zones géographiques suggèrent la présence de facteurs environnementaux. Ces facteurs peuvent être classés en deux catégories : facteurs environnementaux régionaux (la géographie, le climat et les microbes endémiques) et facteurs environnementaux socioculturels (le mode de vie, le tabagisme et les habitudes diététiques) (**Perricone et al., 2011**).

✓ Le tabac

En plus de ses effets connus sur les maladies cardiovasculaires, pulmonaires et sur plusieurs formes de cancer, plusieurs études ont souligné le lien potentiel entre l'intoxication tabagique et l'existence d'un facteur rhumatoïde (FR), ce qui permet de conclure que le tabagisme est fortement impliqué dans le déclenchement de l'AR (**Finckh, 2014**). Il est également suggéré que le tabac soit responsable d'interactions avec les allèles HLA DRB1 codant pour l'épitope partagé et influence certaines réponses immunologiques. En effet, les fumeurs portant ces allèles de susceptibilité sont plus exposés à la maladie et présentent un risque supérieur de favorisé la citrullination des protéines ce qui stimule la production d'auto-anticorps anti-peptides cycliques citrullinés (anticorps anti-CCP) et des FR (**Prete et al., 2011**). Le tabagisme modifie le fonctionnement du système immunitaire. La fumée de cigarette elle-même et la nicotine diminuent l'activité phagocytaire des macrophages et altèrent donc la défense antimicrobienne.

✓ Les agents infectieux

La ressemblance entre les symptômes de certaines arthrites d'origine virale et l'AR ont amené les scientifiques à chercher une origine infectieuse de l'AR. Le phénomène serait lié à la similitude de la structure moléculaire de certains antigènes infectieux avec des antigènes articulaires. Les agents infectieux pourraient donc induire un dysfonctionnement immunitaire et initier la maladie (**Zhang et al., 2015**).

Les agents infectieux viraux

Le virus de l'hépatite C, le virus de la rubéole mais aussi et surtout le virus Epstein Barr ou EBV) ; un candidat puissant qui peut agir aux plusieurs niveaux dans la physiopathologie de l'AR par des mécanismes de mimétisme moléculaire provoqués par des similitudes entre les séquences d'acides aminés des antigènes du « soi » et certains antigènes bactériens ou des protéines virales (**Aletaha et Ramiro, 2018**). Les taux d'anticorps anti-EBV sont plus élevés chez les patients atteints d'AR que chez les patients sains (**Toussirot et Roudier, 2007**).

Les agents infectieux bactériens

Des bactéries comme *E. coli* et *M. tuberculosis* peuvent être responsables de l'apparition de la pathologie par une activation de l'immunité innée (Saber *et al.*, 2011). *S. aureus* est aussi la bactérie responsable de plus de 80 % des infections articulaires chez les patients de l'AR en plus des bactéries Gram-positives qui sont des inducteurs potentiels de la sécrétion des TNF α par les macrophages (Littlejohn et Monrad, 2018).

b. Facteurs nutritionnels

Ils ont fait l'objet de nombreuses études qui ont montré que le risque de l'AR était multiplié par trois chez les gros consommateurs de protéines par comparaison aux faibles consommateurs, les apports en vitamine D étaient faiblement associés à ce risque. La fréquence de l'AR est plus faible dans les pays asiatiques ou méditerranéens où la consommation est moindre de viande rouge, un régime de type méditerranéen (riche en fruits et en légumes, pauvre en viande rouge) améliore les symptômes de la maladie. C'est pourquoi il est recommandé de conseiller aux patients atteints d'AR une diminution de leurs apports en viande rouge ne serait-ce-que pour diminuer la morbidité cardio-vasculaire qui est augmenté chez les arthritiques (Rivera *et al.*, 2001).

c. Facteurs génétiques

Dans l'entourage familial proche d'une personne atteinte, le risque de développer l'AR est multiplié par trois (Frisell *et al.*, 2013). Ainsi, le risque de développer la maladie au cours de la vie est d'environ 2 % pour le fils d'une personne atteinte, 6 % pour la fille et 12 % pour la sœur vraie jumelle d'une femme atteinte.

La survenue de l'AR est significativement associée à certains allèles des gènes codant pour le système HLA de classe II (HLA-DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0101) (Littlejohn et Monrad, 2018). Les molécules HLA codées par ces allèles se caractérisent par une séquence commune d'acides aminés (QKRAA) appelée aussi «épitope partagé» (Ling *et al.*, 2016). Une étude a montré une affinité de l'épitope partagé pour les peptides citrullinés qui représentent un groupe de peptides candidats à l'initiation de l'AR (Hill *et al.*, 2003). En plus des gènes HLA, il existe d'autres facteurs génétiques qui ne sont pas encore identifiés. Globalement, ces facteurs connus et méconnus représentent 30 % du risque de développer une AR (Viatte *et al.*, 2013).

d. Facteurs hormonaux

Comme étant une maladie plus fréquente chez les femmes, la genèse de l'AR peut être influencée par les hormones féminines. **Ostensen et Villiger (2002)**, prenant compte les résultats de plusieurs études, rapportent que la grossesse induit une amélioration ou même la remise de l'activité de la maladie chez 75 % des patients de l'AR (**Hughes et Choubey, 2014**). Alors que l'allaitement et les premiers six mois après l'accouchement sont fréquemment marqués par une période de poussée ; le risque est nettement plus élevé (**Silman et al., 1992**).

On peut aussi noter que l'AR se présente le plus souvent après la ménopause et qu'une ménopause à un âge jeune augmente le risque de l'AR (**Alpizar-Rodríguez et al., 2017**). La réactivation de la maladie se produit chez 90 % des patients. Ceci peut être expliqué par le fait que l'œstrogène stimule, d'une part, ses récepteurs à la surface cellulaire des synoviocytes fibroblaste-like (FLS) augmentant donc la production des métalloprotéinases (MMPase) dans la membrane synoviale, et d'une autre part, elle agit sur les macrophages en augmentant la production du TNF α , induisant ainsi la destruction cartilagineuse (**Firestein, 2008**). Selon **Zrour et al. (2010)**, la réactivation de l'AR après l'accouchement est due aux taux élevés de la prolactine, l'hormone de l'allaitement, qui induit l'initiation et l'augmentation du processus inflammatoire (la différenciation lymphocytaire vers le type LTh1) ainsi que la chute rapide des hormones stéroïdiennes anti-inflammatoire. Il y a certaines évidences que les femmes prenant la pilule contraceptive orale dans le passé, peuvent être protégées contre le développement d'une AR sévère ou dans le moindre l'apparition de la maladie sera retardée (**Bhatia et Majka, 2007**).

e. Facteurs immunologiques

L'AR est également une maladie auto-immune, cela implique un rôle prépondérant du système immunitaire dans la physiopathologie de la maladie. Le système immunitaire permet normalement de reconnaître les agents étrangers comme étant extérieurs à l'organisme afin de les éliminer et à l'inverse de reconnaître ses propres organes et éléments constitutifs comme étant les siens afin de les tolérer.

Dans le cas de l'AR, un dérèglement du système immunitaire fait que les articulations du malade ne sont pas toujours reconnues comme étant les siennes par son système immunitaire. Ce dernier réagi alors contre elles comme s'ils s'agissaient d'agents étrangers (**Sany, 2003**).

Il semblerait que la maladie se développe sur un terrain immunitaire dont la réactivité est exagérée. Plusieurs facteurs immunologiques sont supposés être impliqués dans l'apparition de la pathologie comme par exemple l'excès d'expression des antigènes HLA de classe II sur les cellules ou encore, une anomalie de la clairance et de la solubilisation des complexes immuns (Sany, 2003).

f. Facteurs psychologiques

Il n'existe pas de terrain psychologique particulier qui prédispose à l'AR. Cependant, l'apparition de la maladie elle-même ou une poussée peuvent être induites par un important choc émotionnel (deuil, accident, accouchement...) (Baclé, 2012). La dépression est plus fréquente chez les patients de l'AR (avec une prévalence comprise entre 14 à 48 % en fonction des études) et est associée à une augmentation de la douleur ressentie, du stress et de la fatigue conduisant à une diminution de la qualité de vie des patients. L'AR est aussi connu pour augmenter l'anxiété chez les patients (Sturgeon *et al.*, 2016).

1.2.5. Diagnostic de l'arthrite rhumatoïde

L'AR est une maladie hétérogène sur le plan de la présentation et de la sévérité. Il est important de diagnostiquer l'AR le plus précocement possible. Le diagnostic repose sur un ensemble d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques (Charpin, 2011).

a. L'arthrite débutante

• Examen cliniques

Le tableau clinique au début de l'AR est très variable, les signes les plus fréquents sont la douleur poly-articulaire, la tuméfaction, la chaleur, la rougeur, la raideur matinale et la sensibilisation de certaines articulations. Cette phase initiale peut durer de quelques mois à quelques années ou même plus (Sany, 2003). Dans sa forme de début, l'AR se manifeste généralement 70 % des cas par une oligoarthrite distale d'apparition progressive intéressant les poignets, une ou plusieurs articulations métacarpo-phalangiennes (MCP) ou inter-phalangiennes proximales, parfois l'avant-pied. Dans 20 % des cas, l'AR commence sous la forme d'une polyarthrite aiguë fébrile. Notons qu'à cette phase de la pathologie, aucune déformation articulaire n'est observable. La présentation clinique initiale de l'AR varie grandement selon les individus. Les signes cliniques observés à l'examen du patient varient selon le moment de la journée.

A l'examen matinal, les articulations concernées sont douloureuses à la pression et à la mobilisation et peuvent être légèrement tuméfiées avec parfois un aspect des doigts en fuseau, aspect dit fusiforme des doigts (**CRI, 2012**). Les douleurs réapparaissent alors en fin de soirée et pendant la nuit suivante. L'atteinte s'étend pour devenir bilatérale et symétrique.

• Examen biologiques

Son but est de confirmer un diagnostic de l'AR déjà évoqué sur les données de l'examen clinique, éliminer d'autres étiologies de rhumatisme inflammatoire, évaluer l'évolution et rechercher des éléments du pronostic. Au début, il existe, dans 80 % des cas, un syndrome inflammatoire non spécifique. Le FR peut être présent de façon précoce ; accélération de la vitesse de sédimentation, élévation de la protéine C réactive (CRP) avec prédominance de polynucléaires (**Batteux et Weill, 2003**).

• Examen radiologiques

Un examen radiographique des articulations symptomatiques est réalisé dans les cas de suspicion d'une AR. Les érosions sur les radiographies des mains et des avant-pieds semblent être le critère le plus fiable, la déminéralisation osseuse péri-articulaire se traduisant par une hyper-transparence osseuse autour des articulations ; signe non spécifique présent dans l'ensemble des rhumatismes inflammatoires. Il existe un épaissement des parties molles péri-articulaires (**Combe, 2007**).

b. L'arthrite en phase d'état

L'AR une fois installée tend progressivement vers l'aggravation et l'extension des atteintes articulaires à l'occasion de poussées évolutives au cours desquelles des articulations jusqu'alors indemnes sont atteintes tandis que celles déjà intéressées s'aggravent. La phase d'état est marquée par des atteintes articulaires caractéristiques souvent fixes, bilatérales et symétriques devenant progressivement déformantes, destructrices et invalidantes entraînant un handicap fonctionnel parfois majeur et des déformations.

• Examen cliniques

Les articulations touchées sont le siège d'une inflammation permanente. Lorsque l'inflammation régresse, les articulations peuvent devenir instables et se déformer sous l'action des muscles ce qui aboutit parfois à des déviations articulaires.

Les mains et les pieds sont les articulations les plus fréquemment touchées par la maladie. Les douleurs ont un rythme dit inflammatoire avec un dérouillage matinal supérieur à 30 min. Ces phases durent quelques semaines, c'est le stade où co-existent des signes inflammatoires (téno-synovites ; correspondent à l'inflammation d'un tendon et de sa gaine synoviale) et des déformations articulaires (Clavel, 2004) (figure 2).



Figure 2. Volumineuse téno-synovite des extenseurs avec luxation de la tête cubitale (Sany, 2003).

L'atteinte des mains est la plus fréquente (90 % de l'AR) et souvent la déformation inaugurale de la pathologie. Les déformations des doigts sont très variables, la main par exemple prend un aspect en "dos de chameau", les doigts sont fréquemment déformés, ils deviennent tous vers l'intérieur (coup de vent cubital). On note des modifications morphologiques des doigts " en col de cygne", doigt en M ou Z (Caron et Allan Petterson, 2007) (figure 3).

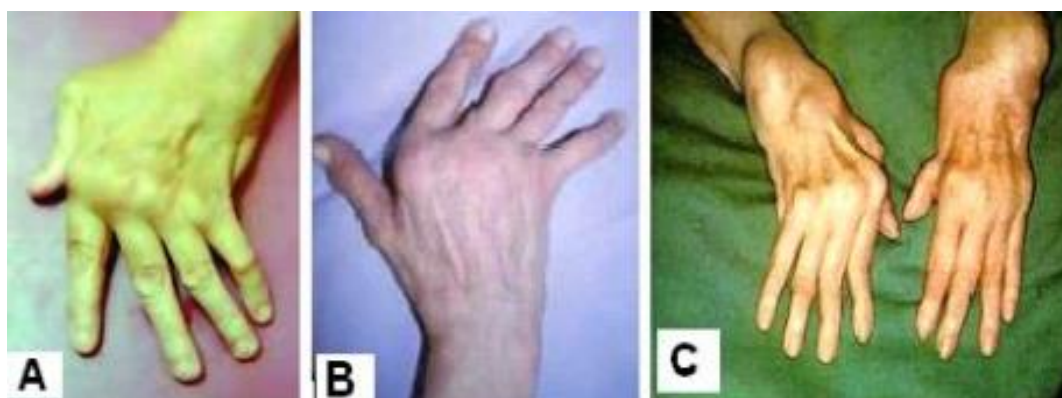


Figure 3. Déformations caractéristiques des mains au cours de l'AR. (A) déviation du « pouce en Z » ; (B) synovite des MCP avec subluxation et déviation en coup de vent cubital des doigts ; (C) des doigts « en maillet » M (CRI, 2012).

• Examen biologique

Près de 90 % des patients souffrant de l'AR présentent des atteintes articulaires au niveau des pieds. L'atteinte la plus caractéristique concerne l'avant-pied, elle est provoquée par la synovite des articulations métatarso-phalangiennes.

En l'absence de traitement, le syndrome inflammatoire tend à s'intensifier, mais il existe des périodes de rémission spontanée. Les autoanticorps restent inchangés. Il est inutile de multiplier les prescriptions de FR, d'anticorps anti-nucléaires et d'anticorps anti-filaggrine (**Batteux et Weill, 2003**). Devant une suspicion d'une AR, certains examens biologiques sont exigés, à savoir un bilan sanguin, des analyses immunologiques et un examen du liquide synovial.

• Bilan sanguin : comprend la recherche du syndrome inflammatoire qui est la vitesse de sédimentation (VS), le dosage de la CRP, l'examen de la formule de numération sanguine (FNS) et la recherche d'une élévation des transaminases afin d'éliminer tout risque d'une atteinte hépatique. L'existence d'une inflammation, se traduit par une accélération de la VS (dépassant 20 mm à la première heure) et une élévation de la CRP (supérieure à 10 mg/L). Les résultats de l'FNS peuvent révéler une thrombocytose inflammatoire et une leucocytose (**Side Larbi, 2016**).

• Analyse du liquide synovial : cette analyse permet de bien mener le diagnostic. Au cours de l'AR, la synovie est inflammatoire et présente donc des quantités importantes de polynucléaires neutrophiles. Cependant, si l'arthrite est d'origine virale, le liquide sera plus riche en lymphocytes (**Marc, 2012**).

• Examen radiologiques

C'est dans cette phase que les signes radiologiques sont les plus caractéristiques. Ils associent une déminéralisation osseuse épiphysaire, un pincement articulaire global, des érosions osseuses et des déformations articulaires par atteinte ténosynoviale. Un bilan radiographique normal ne permet pas en effet, d'écarter le diagnostic de l'AR. Il serait sollicité d'avoir recours à l'échographie articulaire ou à l'imagerie par résonance magnétique (**Gerhad, 2014**).

• Examen histologiques

Dans ce stade la synovite rhumatoïde est histologiquement caractéristique avec une multiplication des cellules bordantes (synoviocytes), des dépôts de fibrine en surface, une nécrose fibrinoïde en profondeur. Des infiltrats lympho-plasmocytaires prenant une organisation nodulaire, à la manière d'un organe lymphoïde (**Diafat, 2014**).

c. L'arthrite rhumatoïde au stade séculaire

Les signes cliniques associent des douleurs inflammatoires et des douleurs mécaniques, secondaires à la destruction articulaire. Les synovites sont plus rares. Le syndrome biologique inflammatoire est souvent réduit, voir absent. L'AR est éteinte, les signes histologiques synoviaux perdent leurs caractéristiques : la synoviale devient fibreuse, l'infiltrat lympho-plasmocytaire est minime ou absent (Diafat, 2014).

• Les manifestations extra-articulaires

Les manifestations extra-articulaires traduisent le caractère systémique de la maladie qui peut toucher de nombreux tissus (Combe, 2007). Elles s'observent surtout au cours des polyarthrites séropositives et érosives et touchent plusieurs localisations : les poumons, les yeux, le système nerveux, le cœur, le muscle, les reins et l'os (Combe, 2007).

Signes généraux

Une fébricule, une asthénie, anorexie, et un amaigrissement peuvent parfois s'observer dans l'AR en poussée (Batteux et Weill, 2003).

Nodules rhumatoïdes

Ce sont des tuméfactions sous-cutanées mobiles ou plus rarement adhérentes uniques arrondies ou polylobées (figure 4). Ce sont les manifestations extra-articulaires les plus fréquentes, s'observant chez 10 à 20 % des malades. Ils apparaissent le plus souvent après quelques années d'évolution du rhumatisme et ils siègent surtout aux coudes et sur la face dorsale des doigts (Bessis, 2007).



Figure 4. Nodules rhumatoïdes au niveau de l'avant-bras (A), au niveau de la poignée et les doigts (B) et au niveau du coude (C) (Combe, 2007).

Vascularite rhumatoïde

Les vascularites correspondent à des inflammations de la paroi des vaisseaux sanguins. La vascularite rhumatoïde est rare, évaluée à 1 % des malades atteints d'AR, mais potentiellement grave. Elle se développe en moyenne 10 à 17 ans après la survenue de l'atteinte (**Bessis, 2007**). Les lésions atteignent surtout les artérioles et les artères de petit calibre, parfois aussi les veinules (**Eyquem et al., 2000**).

Manifestations neurologiques

Les patients atteints de l'AR peuvent présenter des neuropathies sensitivomotrices plus ou moins importantes. Il peut également exister une compression, du nerf cubital au coude ou du nerf médian au poignet, liée aux altérations articulaires (**Arrar et al., 2008**).

Manifestations pleuro-pulmonaires

Les atteintes pulmonaires de l'AR se manifestent par des pleurésies (5 à 20 % des cas) ou des fibroses interstitielles diffuses (**Saravanan et Kelly, 2004**). Certaines atteintes pulmonaires de l'AR sont des complications dues au traitement on cite par exemple la bronchiolite (D-pénicillamine ou tiopronine) ou la pneumopathie d'hypersensibilité (Méthotrexate) (**Mikuls et al., 2016**).

1.2.6. Physiopathologie de l'arthrite rhumatoïde

Dans l'AR, la destruction auto-immune des tissus se présente sous la forme d'une synovite, une inflammation de la capsule articulaire constituée de la membrane synoviale, du liquide synovial et des os respectifs. Cette inflammation articulaire est initiée et entretenue par une interaction complexe entre différents sous-types de cellules dendritiques, les cellules T, les macrophages, les cellules B, les neutrophiles, les fibroblastes et les ostéoclastes. Étant donné que les auto-antigènes spécifiques de l'AR omniprésents ne peuvent pas être complètement éliminés, cette activation contenue des cellules immunitaires entraîne un état inflammatoire chronique dans l'articulation et une multiplication de la membrane synoviale. Ce milieu inflammatoire chronique dans l'articulation arthritique entraîne à son tour une expansion de la membrane synoviale appelée «pannus» qui envahit l'os périarticulaire à la jonction cartilage-os, entraînant une érosion osseuse et une dégradation du cartilage. Le processus physiopathologique de l'AR peut être subdivisé arbitrairement en quatre phases : la phase d'initiation, phase de recrutement et d'inflammation, phase de prolifération synoviale et de destruction articulaire et enfin la phase de réparation articulaire (**Pillon et Michiels, 2013**) (**figure 5**).

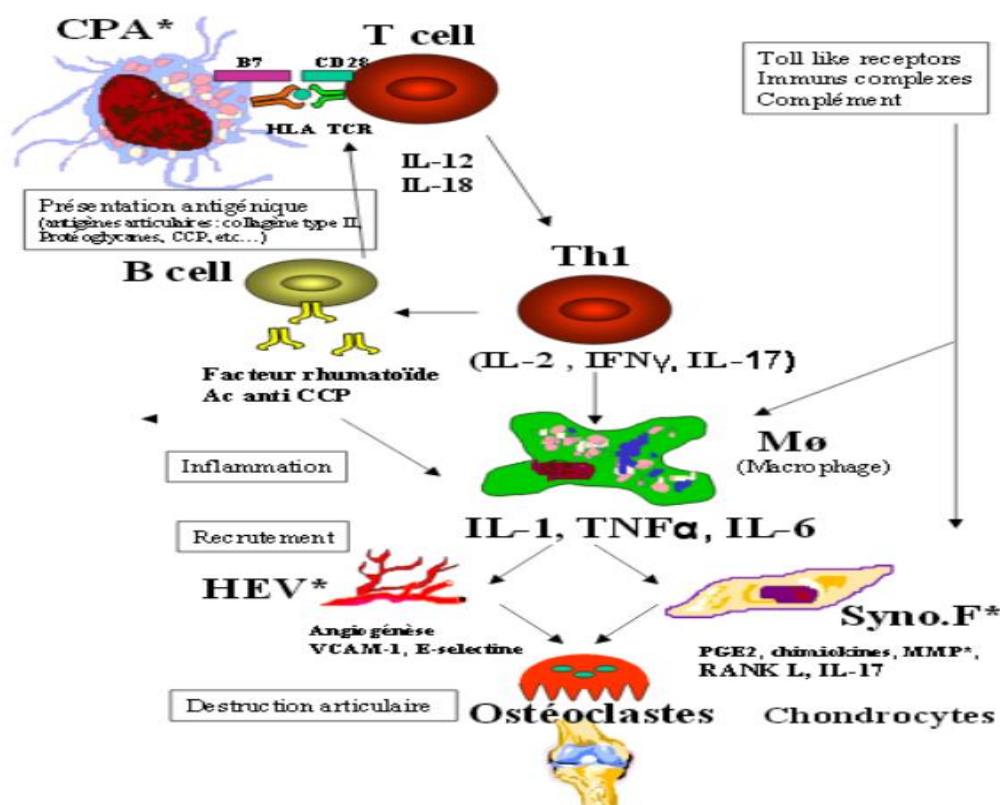


Figure 5. Différentes phases de la physiopathologie de l'arthrite rhumatoïde. HLA : human leukocyte antigen, IL : interleukine ; IFN : interféron, TNF : facteur de nécrose tumorale, HEV : veine endothéliale haute (veinule postcapillaire), VCAM : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire, PG : prostaglandine, MMP : métalloprotéinases, TCR : récepteur des lymphocytes T, RANKL : activateur du récepteur du ligand du facteur nucléaire kappa B (Morel *et al.*, 2004).

a. Phase d'initiation de la réponse immunitaire

Les différents facteurs favorisant l'apparition de l'AR cités précédemment et des dérivés de l'oxygène (reactive oxygen species : ROS) exerceraient à ce niveau leurs influences. Sous l'action de ces facteurs les macrophages s'activent et entraînent l'apoptose de quelques cellules avoisinantes ainsi que l'activation de la peptidylarginine déiminase (Imboden, 2009). Cette enzyme génère des néoantigènes à partir d'auto-antigènes tels que le collagène de type II, la glycoprotéine 39 (GP39), les protéines matricielles, les IgG, la fibrine et les aggrecanes en opérant la citrullination des protéines (Essakallia *et al.*, 2011). Ces protéines citrullinées, reconnues comme non soi, sont captées par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Leur traitement et leur présentation aux lymphocytes T(LT) CD4⁺ sont facilités par la présence de l'épitope partagé dans le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH II) situés sur une CPA (Atouf *et al.*, 2008).

La phase d'initiation implique la stimulation et la maturation des CPA conduisant à la migration et à l'activation des lymphocytes T et B, entraînant la synthèse des anticorps anti-CCP et du FR (Shi *et al.*, 2013). Les anti-CCP circulent et vont se localiser au niveau de l'articulation où ils contribuent au déclenchement de l'inflammation (Weyand et Goronzy, 2017).

b. Phase de développement de l'inflammation dans l'articulation

Les premiers signes de l'inflammation surviennent très rapidement après le déclenchement de la pathologie. A l'inverse de la phase d'initiation, cette seconde étape est principalement dépendante de l'immunité acquise.

➤ **Initiation de l'inflammation**

Les anti-CCP, formés en périphérie, qui ont migré dans l'articulation, reconnaissent et se lient à ces néoantigènes par mimétisme formant des complexes immuns (Sebbag *et al.*, 2004). Ces derniers, dont le fragment Fc de l'Ig est libre, se fixent sur le récepteur du fragment Fc des macrophages synoviaux et des polynucléaires neutrophiles (PNN). L'activation de ces cellules induit une transduction des signaux à travers un ensemble de tyrosines kinases (notamment Syk) et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoire (TNF α , IL 1 et 6), de chimioattractants et de métalloprotéinases. Ces cytokines stimulent l'angiogenèse et augmentent l'expression des molécules d'adhérence cellulaire au niveau de l'endothélium vasculaire (Szekanecz *et al.*, 2009). Ceci permet le recrutement des cellules immunitaires au niveau du site inflammatoire avec la formation de panus synovial (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes T et B) (Firestein et McInnes, 2017).

➤ **Activation des cellules de l'immunité innée**

C'est à ce stade que les événements s'accélèrent. Ainsi, l'activation du système immunitaire va entraîner une infiltration de cellules immunitaires au niveau de la synoviale articulaire et le développement d'une synovite. La composition cellulaire de la synovite comprend d'une part, des cellules participant à l'immunité innée, avec les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les mastocytes et d'autre part, des cellules participant à l'immunité acquise, comme les cellules T (Th1 et Th17), les cellules B, les plasmablastes (Boissier *et al.*, 2012).

Les cellules dendritiques, les macrophages et les synoviocytes sont activés par l'intermédiaire des récepteurs de l'immunité innée et des TLR (récepteurs Toll-Like) qu'ils portent à leur surface (Tran *et al.*, 2005). L'activation de ces TLR, dans l'AR, est déclenchée par la liaison avec leurs ligands endogènes appelés «damage-associated molecular patterns» ou DAMPs (comme la protéine du choc thermique, l'ADN et l'ARN).

Les DAMPs sont générés par un stress oxydatif qui résulte d'une rupture de l'équilibre entre la production des ROS et leur élimination par les antioxydants comme la superoxyde dismutase (**Champy et al., 2007**). La liaison des TLR aux DAMPs entraîne une transduction du signal médiée par quatre protéines adaptatrices, relayées ensuite par plusieurs kinases (initiales et distales) et par trois facteurs de transcription : le «nuclear factor κ B» (NF- κ B), l'activator protein 1 et l'interferon regulatory factor.

Ces facteurs de transcription induisent la synthèse de l'interféron (IFN), du TNF α , des interleukines 1, 6, 10, 12 et de différentes chimiokines par les cellules dendritiques. L'activation des synoviocytes via leur TLR, aboutit à la synthèse de l'IL1, de l'IL6, de la prostaglandine et des MMPs (**Essakalli et al., 2008**). Les macrophages, l'un des effecteurs majeurs de la synovite, agissent via la sécrétion de cytokines, principalement TNF- α , IL-1 β , IL-6 ; ils produisent également des médiateurs de l'inflammation à demi-vie courte, des métalloprotéinases et sont tournés vers la phagocytose et une présentation accrue de l'antigène. L'activation des macrophages est induite par les cytokines, le contact cellulaire (avec les cellules T activées) et les TLR. Des microorganismes ou des ligands endogènes peuvent activer ces TLR (**Boissier et al., 2012**).

c. Phase de destruction articulaire

L'évolution de la synovite est marquée par une altération visible de la membrane synoviale, qui, initialement constituée de 2 à 3 couches cellulaires, passe à plus d'une dizaine de couches cellulaires formant un pannus synovial composé de macrophages et de fibroblastes synoviaux (FLS) (**Firestein et McInnes, 2017**). Les fibroblastes résidentiels adoptent un phénotype presque malin avec une augmentation de l'expression des proto-oncogènes, une inhibition de l'apoptose, une sécrétion de cytokines, chimiokines, enzymes et vont voir leur métabolisme se modifier. Ces changements vont renforcer l'inflammation et participer à la destruction articulaire (**Bustamante et al., 2017**).

L'IL1 et le TNF α participent à cette destruction articulaire en induisant non seulement la synthèse de facteurs de croissance nécessaires à la prolifération de la synoviale, mais aussi la production par les synoviocytes de métalloprotéinases, de cathepsines et de collagénases responsables de la dégradation des principaux composants du cartilage (**Herz et al., 2014**).

d. Phase de réparation

Cette phase a lieu parallèlement à la phase de destruction. Elle est responsable de la fibrose articulaire mais ne compense pas le processus de destruction. Les facteurs de croissance et le TNF induisent la synthèse de collagène et de protéoglycanes par les chondrocytes. Conjointement, les cytokines et notamment l'IL10 inhibent la libération par les cellules synoviales de métalloprotéases de façon dose dépendante. L'IL10 induit également la synthèse d'inhibiteurs des métalloprotéases. Enfin, les facteurs de croissance (EGF, FGF, PDGF) favorisent la croissance des synoviocytes fibroblastiques conduisant à la formation de tissu fibreux cicatriciel (Lacraz *et al.*, 1995).

1.2.7. Stratégie thérapeutique dans le traitement de l'AR

La prise en charge thérapeutique de l'AR vise en premiers lieux à supprimer la synovite et l'inflammation systémique pour ralentir les destructions articulaires. On parle actuellement de la stratégie *Treat to Target*, utilisée dans le domaine de la rhumatologie dont le principe est « d'atteindre un objectif optimal prédéfini ». Dans l'AR, cet objectif optimal est de tendre vers la rémission ou au moins une diminution de l'activité de la pathologie ce qui nécessite un suivi étroit des patients traités (Bergstra et Allaart, 2018). Trois grandes classes de médicaments sont actuellement disponibles pour le traitement de l'AR : les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les corticostéroïdes et les traitements de fond encore appelés médicaments antirhumatique modifiant la maladie (disease modifying anti-rheumatic drugs : DMARD).

a. Traitement symptomatique

Les traitements symptomatiques visent uniquement à réduire la douleur et l'inflammation liées à la pathologie sans chercher la cause. Ils agissent généralement de façon rapide.

➤ Antalgiques

Ce sont des médicaments qui atténuent les sensations douloureuses sans provoquer une perte de conscience ou une dépression des autres sensations. Selon leur puissance et selon le degré de douleur, trois paliers d'antalgiques peuvent être définis : le paracétamol et les opiacés qui sont des dérivés morphiniques comme le tramadol (Delay, 2018).

➤ Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Ajoutant à leur effet anti-inflammatoire, les AINS sont des antipyrétiques et des antalgiques de classe I. Au cours de l'AR, les AINS sont fréquemment prescrits pour leurs

actions rapides et puissantes contre la douleur et les gonflements au niveau des articulations (**Hamdi et al., 2021**). Les médicaments de cette classe thérapeutique possèdent la capacité de bloquer l'activité de l'enzyme cyclo-oxygénase qui catalyse la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine leukotriène et thromboxane (**Brune et Patrignani, 2015**). Les formes galéniques les plus utilisées en AR sont les dérivés propioniques (Profénid®, Bi-Profénid®), les dérivés de l'indole avec l'indométacine (Indocid®), les dérivés acylacétiques avec le diclofénac (Voltarène®) et les oxicams (Feldène®).

➤ **Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) (Glucocorticoïdes)**

La corticothérapie est un puissant anti-inflammatoire, très souvent prescrit au cours de l'AR débutantes ou avérées et dont l'efficacité à court terme sur les signes inflammatoires est démontrée (**Littlejohn et Monrad, 2018**). L'action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes est due au blocage de l'acide arachidonique suite à l'inhibition de phospholipase A2, empêchant ainsi la sécrétion des prostaglandines. Ces glucocorticoïdes possèdent également une action immunomodulatrice par l'inhibition de la production de certains acteurs de l'inflammation (interleukines 1 et 2, interférons...) (**Dejean et Richard, 2013**).

b. Traitement de fond

Contrairement aux traitements symptomatiques qui agissent uniquement sur les symptômes de l'AR, les traitements de fond ont un réel effet sur la cause et par conséquent, sur l'évolution de la pathologie. Appelés aussi DMARD (**Aletaha et Ramiro, 2018**).

➤ **Le méthotrexate (MTX)**

L'agent de rémission le plus utilisé dans le traitement de l'AR. Il s'administre de façon hebdomadaire par voie orale ou parentérale. Le traitement débute à une dose de 7.5 à 25 mg chez les patients de l'AR par voie orale ou sous-cutanée (**Smolen et al., 2017**). Son délai d'action est de 4 à 8 semaines. Ses mécanismes d'action ne sont pas parfaitement connus. Elle a des effets sur les cytokines (inhibition de l'activité des interleukines IL-1 et IL-6 et augmentation de l'expression génique de l'IL-10), des effets immunosuppresseurs (diminution de la synthèse des IgM et du FR), des effets anti-inflammatoires (réduction du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles, et de l'activation des macrophages) (**Brown et al., 2016**).

➤ **Léflunomide**

Constitue un traitement alternatif en cas de contre-indication ou d'intolérance au MTX. Le traitement débute par une dose de charge de 100 mg /j pendant trois jours puis une dose d'entretien à la posologie de 10 à 20 mg/j (**Smolen et al., 2017**).

➤ **Sulfasalazine (Salazopyrine®)**

Présente un délai d'action de 1 à 2 mois. La dose de départ est de 500 mg/semaine, augmentée de 500 mg/j, jusqu'à une posologie maximale de 2 à 3 g/j. Exercent une activité anti-inflammatoire par inhibition des cyclo-oxygénases (**Delay, 2018**).

c. Place de l'immunothérapie dans le traitement de fond

L'immunothérapie est définie comme une méthode de traitement consistant à modifier les réactions immunitaires de l'organisme soit en les stimulant, soit en les corrigeant quand elles sont pathologiques, soit en les supprimant (**Quevauvilliers et al., 2009**).

➤ **Les inhibiteurs des cytokines**

Anti-TNF α : ces médicaments sont capables de bloquer ou d'inactiver le TNF α , l'une des cytokines les plus impliquées dans la réponse inflammatoire et les destructions ostéoarticulaires. Trois médicaments sont actuellement commercialisés : l'adalimumab (Humira®), l'étanercept (Enbrel®), l'infliximab (Remicade®) (**Delay, 2018**).

Anti-IL-6 : ce médicament est le premier anticorps monoclonal inhibiteur du récepteur de l'IL-6 appelé Tocilizumab ou Ro-Actemra® (**Mihara et al., 2011**). Prescrit à la posologie de 4 à 8 mg/kg toutes les quatre semaines par voie intraveineuse ou à la dose de 162 mg par semaine par voie sous-cutanée (**Smolen et al., 2008**).

Anti-IL-1 : l'IL-1 est un médiateur clé de la résorption osseuse et de la destruction cartilagineuse au cours de l'AR. La liaison de l'IL-1 à son récepteur IL-1R1 est empêchée par l'IL-1Ra (Anakinra) qui est une cytokine existant à l'état naturel. Sa demi-vie est de 6 h, et sa biodisponibilité de 95 % après injection sous cutanée. Il est préconisé à la posologie de 100 mg/j en injection sous-cutanée (**Delay, 2018**).

➤ **Les modulateurs de la stimulation des lymphocytes**

Modulateur des lymphocytes T (l'Abatacept) : un modulateur soluble du signal de co-stimulation CD80/CD86 nécessaire à l'activation des LT. C'est une protéine de fusion formée par le CTLA4 et un fragment d'immunoglobuline G (**Bozec et al., 2018**). Il est capable de bloquer les LT sans les éliminer ce qui calme l'action auto-immune de ces lymphocytes.

Il est efficace à la posologie de 10 mg/kg en perfusion intraveineuse toutes les deux ou quatre semaines ou à la dose de 125 mg par semaine par voie sous-cutanée (**Keating, 2013**).

Modulateur des lymphocytes B, le Rituximab : est un anticorps monoclonal humanisé contre le CD20. Elle a montré son intérêt dans certaines affections auto-immunes en permettant de rétablir la tolérance lymphocytaire B. Le rituximab, utilisé à la posologie de 1 g en perfusion intraveineuse à j1 et à j15, associé au MTX (**Tavakolpour et al., 2019**).

d. Traitement chirurgical

Il est connu que l'AR peut provoquer des lésions articulaires et osseuses persistantes, rendant ainsi les traitements antérieurs inefficaces. Le recours à la chirurgie sera donc privilégié. La décision nécessitera une concertation multidisciplinaire avec le patient, le chirurgien, le rhumatologue et une équipe de rééducation fonctionnelle. La chirurgie a pour objectif d'améliorer le fonctionnement de l'articulation en arrêtant sa destruction par excision du pannus synovial ; c'est la chirurgie dite conservatrice. Une excision du tissu synovial et du cartilage détruit est réservée aux destructions majeures de l'articulation ; c'est le cas de la chirurgie dite non conservatrice (**Nizard, 2005**).

e. Place des produits naturels dans le traitement de l'AR

Tous les traitements de fond ou symptomatiques utilisés dans la prise en charge de cette pathologie présentent d'ailleurs des effets indésirables à ne pas négliger. Une approche englobant la diète, certains suppléments et des produits naturels peut être bénéfique pour le patient arthritique et pourrait s'insérer dans la démarche de prise en charge de sa santé (**Stamp et al., 2005**).

Huiles de poisson : Les huiles de poisson sont connues pour leur efficacité dans les pathologies inflammatoires. Etant une source d'acide gras polyinsaturé oméga-3 y compris l'acide eicosapentaénoïque, ces huiles agissent directement sur le site de l'inflammation. Elles augmentent la synthèse des médiateurs anti-inflammatoires par rapport à ceux pro-inflammatoires (**Wall et al., 2010**).

Phytothérapie : Le recours aux plantes pour le traitement de l'AR se base sur la recherche de celles ayant un effet anti-inflammatoire. Certaines plantes tels que la griffe du diable (**Chrubasik et al., 2002**), le gingembre (**Andersen et al., 2000**) et le piment de Cayenne (**Zimmer et al., 2012**) ont prouvé leurs effets anti-inflammatoires voire même antiarthritiques *in vitro* et *in vivo* (**Okoli et al., 2007**).

Chapitre 1 : Les maladies inflammatoire

Ces dernières années, l'utilisation des plantes est devenue courante en médecine. Elles sont utilisées pour leurs vertus antalgiques, anti-inflammatoires et chondroprotectrices (**Hanser, 2009**). Estimant que leurs effets secondaires sont moins nombreux, les préparations à base de plantes médicinales sont sujettes à de nombreux travaux sur la recherche de molécules alternatives aux traitements synthétiques. La phytothérapie peut donc occuper une place dans le traitement de l'AR.

II. Stress oxydant

2.1. Définition

Le stress est défini comme un déséquilibre de la balance entre la formation des radicaux libres (caractère pro-oxydant) et la capacité du corps à les neutraliser, à réparer les dommages oxydatifs (système antioxydant) et à réguler leur production (**Zweier et al., 2006**). Ce déséquilibre peut endommager certaines macromolécules (acides nucléiques, lipides et protéines), conduisant à l'apparition des diverses maladies (**Pisoschi et Pop, 2015**). Les radicaux libres peuvent être dérivés de l'oxygène (espèce réactive d'oxygène : ERO) ou d'autres atomes comme l'azote (espèce réactive d'azote : ERA). Divers types cellulaires et tissus donnent naissance aux radicaux libres par des réactions enzymatiques ou par auto-oxydation au cours de leur métabolisme normale et parfois en réponse à un stimulus spécifique.

2.2. Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) incluent les radicaux libres possédant au moins un électron libre sur la couche externe (radical hydroxyl $\text{OH}\cdot$, superoxyde $\text{O}_2\cdot^-$, le radical peroxy $\text{ROO}\cdot$) et les dérivés non radicalaires, dont la réactivité est très élevée comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet et l'acide hypochloreux (HOCl) (**Cuzzocrea et Reiter, 2001**). A cause de leur hyper-réactivité, les radicaux libres ont une demi-vie très courte. Les espèces réactives de nitrogène sont dérivés de l'oxyde nitrique ou du monoxyde d'azote comme le radical monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$), l'anion peroxydinitrite (ONOO^-) et le radical dioxyde d'azote ($\text{NO}_2\cdot$) (**Finaud et al., 2006**).

2.3. Rôle des ERO dans la physiopathologie de l'AR

Les ERO sont caractérisés par leur courte demi-vie et par leur haute réactivité. De nombreux arguments suggèrent leur rôle central dans l'initiation et l'évolution de l'AR (**Aljoboury et al., 2020**). Plusieurs recherches ont rapporté qu'il existe un déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les oxydants dans le cas de l'AR. En 2000, Sung et ses collaborateurs ont démontré que l'IL-6 exprimé dans le pannus rhumatoïde induit une augmentation de la production des ERO par les synoviocytes fibroblastiques. De même, **Bedina et al. (2021)** ont démontré précédemment qu'une élévation de l'activité xanthine oxydase a été constatée dans les sérums des patients atteints de l'AR en comparaison avec des donneurs sains.

En effet, la présence des ERO dans le pannus rhumatoïde a pu être révélée par une augmentation des lésions qu'elles engendrent sur la matrice extra-cellulaire, les lipides et les protéines. De même, des taux élevés de protéines oxydées sont observés dans le liquide synovial et le plasma des patients souffrants d'AR (**Lemarechal et al., 2006**). Il existe également des traces d'une peroxydation lipidique dans cette pathologie (**Dai et al., 2010**). L'oxydation des LDL entraîne une accumulation de ces lipides proinflammatoires sous l'intima vasculaire où ils sont ensuite phagocytés par les macrophages. Par ce mécanisme, les ERO participent à l'accélération de l'athérosclérose qui constitue la première cause de la mortalité dans l'AR (**Avina-Zubieta et al., 2008**).

Des études épidémiologiques indiquent que la consommation de molécules antioxydantes réduit le risque de développer l'AR. La consommation de la vitamine C ou la vitamine E diminue de 30 % l'incidence d'une AR (**Cerhan et al., 2003**). Ces résultats sont confortés par une étude finlandaise qui a montré que la probabilité de survenue d'une AR était inversement proportionnelle à la concentration plasmatique des antioxydants dosés (α -tocophérol, β -carotène et sélénium). De plus, l'activité de la glutathion réductase est augmentée chez les patients atteints de l'AR (**Aljoboury et al., 2020**).

2.4. Les antioxydants

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des ERO est particulièrement fragile. La production des ERO est strictement régulée par notre organisme qui a développé des moyens de défense antioxydants de protection contre les effets potentiellement destructeurs des ERO. Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (**Berger, 2006**).

Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques (le superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase) (**Ighodaro et al., 2018**). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l' $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire et systèmes non enzymatiques (la vitamine C, la vitamine E, les caroténoïdes et les polyphénols) (**Smirnoff, 2018**).

III. Présentation de la plante *Peganum harmala* L.

La plante *Peganum harmala* L. appartient à la famille des Zygophyllacées qui comprend environ 285 espèces, et se subdivisent en cinq sous-familles et 27 genres (Li *et al.*, 2017). Cette famille est largement distribuée dans les régions arides, semi-arides, les terrains salés, et les pâturages désertiques (Asgarpanah et Ramezanloo, 2012), et elle est connue pour l'effet bénéfique de certaines espèces pour l'homme tel que l'espèce de *Peganum harmala* L.

3.1. Description botanique

Peganum harmala L. est l'une des plantes les plus utilisées en médecine traditionnelle à des fins rituelles, magiques et surtout thérapeutiques (Achour *et al.*, 2012). Le genre *Peganum* tient son nom du grec et est attribué aux espèces de la rue, alors que le nom de l'espèce *harmala* dérive de celui de la ville Libanaise ; Hermel (Mars, 2009). *P. harmala* est une plante herbacée, vivace, glabre et pluriannuelle qui peut atteindre 80 cm de hauteur, et la racine peut atteindre une profondeur allant jusqu'à 60 cm, à rhizome épais et à odeur forte, désagréable quand on les froisse qui rappellent celle de la rue (Singhai et Patil, 2021) (figure 9).

➤ **Les tiges** : dressées, très rameuses qui disparaissent durant l'hiver, possèdent des entrenœuds assez courts et densément feuillés. Elles portent des feuilles alternes et découpées en lanières étroites. À leur extrémité, s'épanouissent les fleurs solitaires, assez grandes (25 à 30 mm) (Bouziane, 2012).

➤ **Les feuilles** : sont alternes, charnues d'un vert vif, palmées en 3-5 lobes linéaires de 3-6 cm de long et 1.5-3.0 mm de large (Shahrajabian *et al.*, 2021). Elles sont allongées et irrégulièrement divisées en multiples lanières très fines pouvant atteindre 5 x 5 cm (Bouziane, 2012) (figure 6).

➤ **Les fleurs** : apparaissent sur les sommets des branches qui portent des pétales de couleur jaune blanchâtre (Shahrajabian *et al.*, 2021) (figure 6).

➤ **Les fruits** : sont des petites capsules sphériques à trois chambres, de 0.9-1.3 cm de diamètre, entourée des sépales persistants et s'ouvrant par 3 ou 4 valves pour libérer les graines. Il est de couleur verte lorsqu'il est mûr et brun orangé à maturité coriace (Shahrajabian *et al.*, 2021) (figure 6).

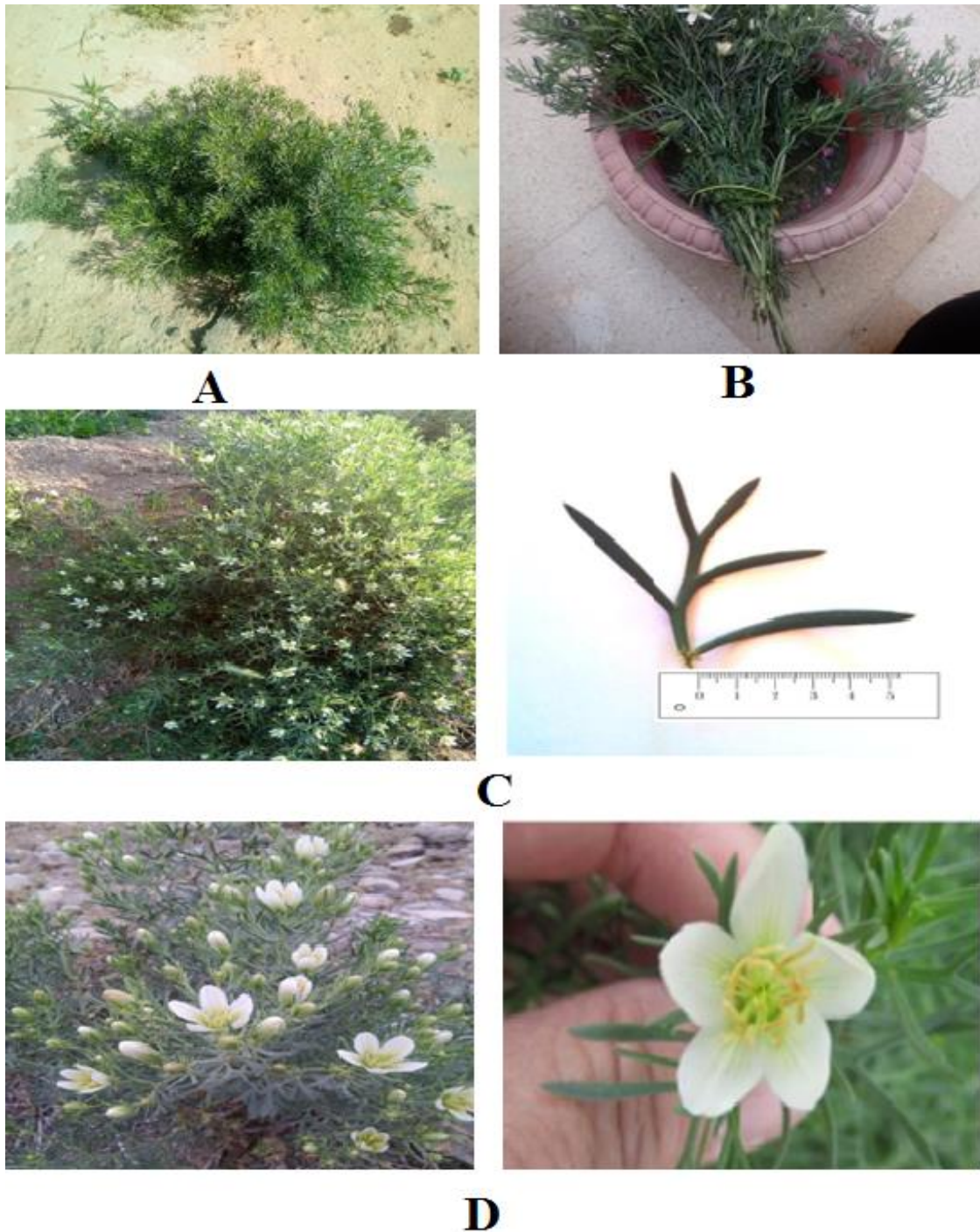


Figure 6. Les différentes parties du plant de *Peganum harmala* L. A : Arbuste, B : les tiges, C : les feuilles, D : les fleurs (**Photo personnelle**).

➤ **Les graines** : sont nombreuses, petites, anguleuses, sub-triangulaires, de couleur marron foncé, dont le tégument externe est réticulé. Elles ont une saveur amère et sont récoltées en été (Shahrajabian *et al.*, 2021) (figure 7).

➤ **La racine** : est oblongue, dure et garnie de fibres. Elle peut atteindre plus de 30 cm de profondeur (Shahrajabian *et al.*, 2021).

Chapitre 3 : Présentation de la plante *Peganum harmala* L.

3.2. La classification botanique

La position systématique de *P. harmala* L. est comme suit (Ozenda, 1991) :

Embranchement	Spermaphyta
Sous embranchement	Angiospermae
Classe	Eudicots
Sous classe	Rosidae
Ordre	Sapindales
Famille	Zygophyllaceae
Genre	<i>Peganum</i>
Espèce	<i>Peganum harmala</i> L.

3.3. Nomenclature et appellation

- **Nom latin** : *Peganum harmala* L. ;
- **Nom commun** : Rue sauvage, Rue verte, Pégane (Lamchouri et al., 2000);
- **Nom vernaculaire** : Harmel, Armel, l'harmel (l'Afrique du Nord) (Mahmoudian et al., 2002), Pégane et Rue sauvage ou Rue verte (en France) (Asgarpanah et Ramezanloo, 2012), Harmel Sahari 'حرمل الصحاري' (en Algérie) (Ozenda, 1977), Bender tiffin (en Maroc) (Achour et al., 2012), Bizr el harmel (en Egypte) (Quezel et Santa, 1963), Espand (Iran) (Allaq et al., 2021), African Rue, Syrian rue, Mexican Rue (Etats-Unis) (Mahmoudian et al., 2002), yüzerlik or üzerli (en Turquie) (Allaq et al., 2021).

3.4. Répartition géographique

P. harmala, est une espèce cosmopolite très commune sur les sols sableux et un peu nitrés, dans tous les hauts plateaux et le Sahara septentrional ; manque au sud, sauf dans les montagnes du Sahara central (Elansary et al., 2020). *P. harmala* L. est une plante endémique des zones arides et semi- arides.

3.5. Etudes phytochimiques

Des études phytochimiques réalisées sur la plante de *P. harmala* L. ont permis d'isoler plusieurs types de composés chimiques à partir des graines, feuilles, fleurs, tiges et des racines. Elle est très réputée pour sa richesse exceptionnelle en alcaloïdes (du type β -carbolinique).

Chapitre 3 : Présentation de la plante *Peganum harmala* L.

a. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des composés hétérocycliques azotés et basiques, le plus souvent d'origine végétale, ils sont synthétisés à partir des acides aminés (la lysine, l'ornithine, la tyrosine et le tryptophane) (Bhat *et al.*, 2005). Elles peuvent être aussi d'origine animale où ils peuvent agir comme des neurotransmetteurs dans le système nerveux central ou périphérique comme la sérotonine et la dopamine (Brielemann *et al.*, 2006).

P. harmala L. est très riche en alcaloïdes indoliques (dérivés de l'acide aminé tryptophane) du type β -carboliniques (Senhaji *et al.*, 2022). Les plus importants sont l'harmaline ($C_{13}H_{14}N_2O$), harmalol ou harmol ($C_{12}H_{12}N_2O$), l'harmane ($C_{12}H_{10}N_2$), l'harmine ($C_{13}H_{12}N_2O$) et le tetrahydroxyharmane (THH) et harmalidine (Saeedeh *et al.*, 2022).

Les graines de *P. harmala* contiennent également une autre classe d'alcaloïdes ; les quinazolines, dont le précurseur est l'acide anthranilique et qui sont représentés par la vasicine (péganine) ($C_{13}H_{15}ON_2$), péganol, le vasicinone ($C_{11}H_{10}O_2N_2$) (figure 7), et la desoxypéganine (Saeedeh *et al.*, 2022).

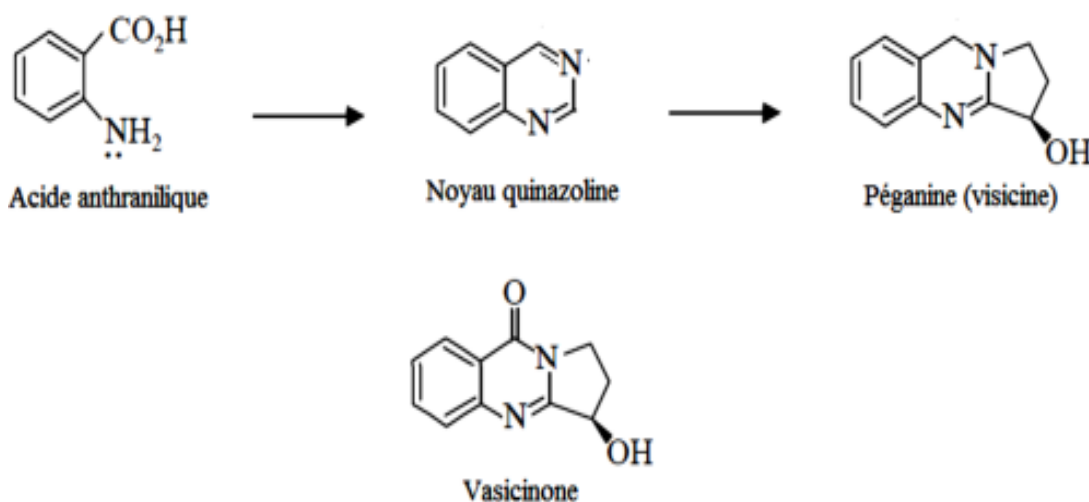


Figure 7. Structure générale des quinazolines de *P. harmala* L. (Aniszewski, 2007).

Les alcaloïdes de *P. harmala* sont des sources potentielles de médicaments originaux (Daskaliyev *et al.*, 2021). Elles sont aussi douées de propriétés toxiques dont le taux est plus élevé dans les graines (3 à 4 %) (Shaheen et Issa, 2020). Les doses toxiques de divers alcaloïdes dans différentes espèces sont montrées dans le tableau 1 (Mahmoudian *et al.*, 2002).

Chapitre 3 : Présentation de la plante *Peganum harmala* L.

Tableau 1 : Les doses toxiques des alcaloïdes β -carbolines sur différentes espèces (Mahmoudian *et al.*, 2002).

Alcaloïdes	Réponse	Animale	Dose mg/kg
Harmaline	DL-sc	Rats	120
Harman	DL-sc	Lapins	200
Harmine	DL50-iv	Souris	38
Harmine	DL-sc	Rats	20

b. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires d'un poids moléculaire élevé. Ils sont largement distribués dans le règne végétal (Lebham, 2005). L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés à un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre). Elles sont des molécules hydrosolubles, ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes) (Milane, 2004). L'analyse de l'extrait méthanolique de *P. harmala* révèle que cet extrait est plus riche en polyphénols (Senhaji *et al.*, 2022).

c. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires, presque toujours hydrosolubles. Tous les flavonoïdes possèdent un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C₆ (A et B), reliés par une chaîne en C₃ en formant ainsi l'hétérocycle (C) (Tapas *et al.*, 2008). Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur le cycle C : les flavonols, les flavones, les flavanones, les flavan-3-ols, les isoflavones et les anthocyanes (Sadasivam et Thayumanavan, 2003). L'analyse de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *P. harmala* L. a permis d'isoler quatre flavonoïdes ; glycosides acacétin 7-O - rhamnoside, 7-O -6"-O-glucosyl-2"-O-(3"-glucoside d'acetylramnosyl), 7-0-(2"-0-rhamnosyl-2"-O-glucosylglucoside) et glycoflavone 2"-O rhamnosyl-2"-O-glucosylcytioside (Sharaf *et al.*, 1997).

d. Les terpènes ou terpénoïdes

Les terpènes constituent une grande famille de composés pré-nologiques, c'est-à-dire d'homologues à enchaînement isoprénique. Le terme de terpénoïdes constituent le groupe de métabolites secondaires des plantes le plus abondant, ils sont formés par la polymérisation des unités à 5 atomes de carbone (isoprène) (Malecky, 2005).

Chapitre 3 : Présentation de la plante Peganum harmala L.

Jusqu'à présent, dix triterpénoïdes ont été identifiés à partir du genre *Peganum*. Quatre triterpénoïdes : l'ester méthylique de l'acide 3, 27-dihydroxyl-20 (29) -en-28-oïque, ester méthylique de l'acide 3 -acétoxy-27-hydroxylup-20 (29) -en-28-oïque et acide 3 -acétoxyolean-12-ène-27,28-dioïque 28-méthylester ont été isolés de l'extrait éthanolique des racines de *Peganum nigellastrum* (Ma *et al.*, 2007).

e. Anthraquinones

Une étude réalisée sur les graines de *P. harmala* L. a permis d'isoler trois anthraquinones ; la peganone I, la peganone II et l'anthraquinone glucoside (Li, 2005).

f. Autre composée

Une recherche sur les qualités organoleptiques de l'huile des graines de *P. harmala* L. a montré qu'elle était comestible (Asadzadeh *et al.*, 2021). La plupart des composés de l'huile essentielle de graines de *P. harmala* comprend le 2,3-diméthyl benzofurane (28.32 %), l'oxyde de cis-linalool (7.46 %), le [2E]-décénal (6.57 %), la 4 α ,7 β ,7 α -népétalactone (6.49 %), 3-oxo-p-menth-1-en-7-al (6.36 %) et trans- β -terpinéol (5.86 %) (Asadzadeh *et al.*, 2021). *P. harmala* contiennent aussi des tanins, stérols-triterpènes, glucides et des acides aminés (phénylalanine, valine, proline, thréonine, histidine, acide glutamique) (Melloul *et al.*, 2022).

Trente et un composés volatils ont été identifiés à partir des organes frais et secs de *P. harmala* telles que la N-acétylaniline et l'aniline. Les feuilles sont plus riches qualitativement en ces composés que les tiges et les racines (tableau 2) (Tahrouch *et al.*, 2002). Les graines de *Peganum harmala* se caractérisent par une teneur particulièrement élevée en potassium (111.62 mg/L) et en fer (64.40 mg/L) (Senhaji *et al.*, 2022).

Tableau 2 : Les substances volatiles rencontrées chez *P. harmala* L. (Tahrouch *et al.*, 2002).

Partie de la plante	Etat	Nombre de composé volatils	Composés essentiels
Feuilles	Fraiche	12	Nacétylaniline ; aniline ; isoquinoline.
	Sèches	19	2,3-dihydrobenzofurane ; acide propylique.
Tige	Fraiche	06	2,3-dihydrobenzofurane ; pipéritenone.
	Sèches	13	3-octanone ; l'acide propylique ; N-formylaniline
Racines		06	L'acide propylique ; l'acide tiglique.

3.6. Utilisation traditionnelle

Depuis un temps reculé, *P. harmala* est un remède populaire largement utilisé en médecine traditionnelle et en pharmacologie (Shaheen et Issa, 2020). Quelques formes en usage au monde pour illustrer la diversité d'emplois de cette plante, sont rapportées ci-dessous :

a) Usage externe : la plante fraîche après extraction du suc pour la composition d'un liniment à base de graisse de mouton et les grains en friction mêlée au miel et au gingembre est utilisée pour soigner les douleurs articulaires et les rhumatismes. Abolhassan *et al.* (2015), ont démontré que l'application topique d'huile de Peganum pour l'arthrose du genou est un traitement efficace contre la douleur. La poudre des graines de *P. harmala* est utilisée en fumigation pour le tétanos néonatal (Farouk *et al.*, 2008), les affections génitales féminines, les maladies mentales et nerveuses, les insomnies de l'adulte et de l'enfant (Hammiche *et al.*, 2013) et pour dissiper les troubles de l'anxiété et les convulsions des enfants (Mamedov *et al.*, 2018). Le cataplasme de feuilles hachées, appliquées *in situ* et maintenues par un foulard, contre les rhumatismes, les céphalées, la toux et les affections pulmonaires, les morsures de serpents (Tahri *et al.*, 2004). De même elle est bouillie avec de l'huile d'olive est utilisée pour améliorer la qualité des cheveux. Un colorant rouge obtenu à partir de ses graines est largement répandu en Turquie et en Iran pour la coloration de la laine et des tapis (Mamedov *et al.*, 2018).

L'encens de graines est utile pour les maux de dents et repousse les moustiques et les graines brûlées peuvent être utilisées comme antiseptique (Niroumand *et al.*, 2015).

b) Usage interne : dix à trente graines de *P. harmala* L. deux fois par jour est utilisée contre le diabète, l'hypertension artérielle et les parasites intestinaux (Hammiche *et al.*, 2013). Shatarat *et al.* (2014), ont indiqué que l'extrait de racine de *P. harmala* possède une activité antispasmodique et justifie traditionnellement son utilisation pour soulager les troubles gastro-intestinaux. Shirani-Boroujeni *et al.* (2017) ont noté que l'application de graines de *P. harmala* peut être utile pour réduire les symptômes urinaires chez les patients atteints d'hyperplasie bénigne de la prostate. D'autre part, l'huile de ces graines est largement utilisée comme un remède pour les douleurs rhumatismales et l'asthme (Aouadhi, 2010) et pour les troubles cutanés (l'eczéma et les brûlures) (Monsef *et al.*, 2004). Les feuilles en décoction sont mentionnées pour l'hypertension artérielle et les racines en décoction sont indiquées pour les hémorroïdes (IUCN, 2005).

Chapitre 3 : Présentation de la plante Peganum harmala L.

Elles sont employées par certaines populations pour traiter certains désordres de système nerveux tels que la maladie de Parkinson (**Rezaei et al., 2016**) et en conditions psychiatriques comme la nervosité (**González et al., 2010**).

3.7. Activités pharmacologiques de *Peganum harmala L.*

3.7.1. Effets cardiovasculaires

La plante de *P. harmala* est plus utilisée pour traiter l'hypertension et les maladies cardiaques. Des expériences *in vivo* ont montré que différents extraits de *P. harmala* où ses principaux alcaloïdes actifs (harmine, harmaline, harman et harmalol), ont des effets cardiovasculaires différents, tels que la bradycardie, la diminution de la pression artérielle (**Shahrajabian et al., 2021**) et des effets inhibiteurs antigéniques (**Hamsa et Kuttan, 2010**). Il y a eu quelques études menées sur les effets directs de l'extrait de *P. harmala* et ses alcaloïdes sur le muscle cardiaque (**Shahrajabian et al., 2021**).

3.7.2. Effets sur le système nerveux

Diverses études *in vitro* et *in vivo* ont indiqué une large gamme d'effets produits par des alcaloïdes de *P. harmala* à la fois sur le système nerveux central et périphérique y compris, l'analgésie, l'hallucination, excitation et l'effet antidépresseur (**Shahrajabian et al., 2021**).

3.7.3. Effet cytotoxique

L'action de *P. harmala* n'est pas restreinte aux effets neuropharmacologiques, ils peuvent aussi avoir une action cytotoxique en intercalant entre les bases azotées de l'ADN ce qui mène donc à l'inhibition d'ADN Topoisomérase I, et par conséquent, l'inhibition de la réplication de l'ADN et la division cellulaire (**Shaheen et al., 2019**).

3.7.4. Effets antibactérien, antifongique, insecticide et antiparasitaire

Diverses études ont montré différents effets pharmacologiques des graines de *P. harmala* comme antiparasitaires (**Kebbi et al., 2020**), anti-leishmanienne (**Rokni et al., 2021**) et anti-protozoaire (**Saleem et al., 2020**). **Behidj-Benyounes et al. (2015)**, montre que l'extrait éthanolique, aqueux et hexanique des feuille de *P. harmala* possède un effet antimicrobienne contre les bactéries Gram + et certains bactéries Gram-. Il y a eu quelques rapports sur l'activité insecticide des bêta carbolines dérivées de *P. harmala* indiquant leurs effets inhibiteurs sur le développement et la croissance des stades larvaires de certains insectes (**Al-Mekhlafi et al., 2022**). L'effet antiviral des graines de *P. harmala* contre l'hépatite A et l'herpès génital a été prouvé (**Dashti, 2020**).

Chapitre 3 : Présentation de la plante Peganum harmala L.

3.7.5. Effets anticancéreux

Depuis longtemps, diverses préparations de *P. harmala* ont été utilisées dans le traitement de cancers et des tumeurs (**Zhang et al., 2021**). Les alcaloïdes β -carboline dérivés de *P. harmala*, en particulier l'harmine, présentent des propriétés anticancéreuses notables en ciblant l'apoptose, l'autophagie, la prolifération cellulaire anormale, l'angiogenèse, les métastases et la cytotoxicité (**Jalali et al., 2021**). Plusieurs chercheurs ont montré la cytotoxicité de différents extraits de *P. harmala* sur des lignées cellulaires tumorales *in vitro* et *in vivo* (**Chen et al., 2005 ; Ouzid et al., 2019**).

3.7.6. Effet hypothermique

L'harmaline (30 mg/Kg) injectée par voie intraperitoniale chez le rat provoque une baisse de la température. En effet, **Bruinvels et Sourkes (1968)** ont montré que l'administration intraperitoniale de l'harmane à 25 mg/Kg et de l'harmalol à 28 mg/Kg, qui sont des dérivés de l'harmaline font baisser la température corporelle. Ultérieurement **Abdelfattah et al. (1995)**, ont montré que les alcaloïdes totaux des graines de *P. harmala* ont un effet hypothermique.

3.7.7. Effets antidiabétiques

Des études récentes ont indiqué clairement que l'extrait éthanolique des graines de *P. harmala* réduit significativement le taux de glucose sanguin chez des rats normaux et diabétiques à des doses variables (150 et 250 mg/kg) (**Komeili et al., 2016**). **Singh et al. (2008)**, ont montré que l'extrait éthanolique de *P. harmala* est aussi efficace pour réduire la glycémie de rats normoglycémiques et diabétiques induits par la streptozotocine.

3.8. Données toxicologiques de la plante

Malgré les nombreux rapports d'intoxication humaine et animale enregistrés suite à l'ingestion de *P. harmala*, cette plante a été largement utilisée en médecine traditionnelle (**Duke, 2002**). L'efficacité d'une substance en pharmacologie n'est pas suffisante pour justifier son éventuelle introduction en thérapeutique. Il faut donc définir le rapport bénéfices risques dans l'indication thérapeutique de chaque substance. Pour qu'une drogue possédant des effets pharmacologiques puisse éventuellement être utilisée comme médicament, il est d'abord nécessaire que l'activité apparaisse à des doses pour lesquelles la toxicité est négligeable (**Bensimon et al., 2006**).

Chapitre 3 : Présentation de la plante *Peganum harmala* L.

3.8.1. Circonstance(s) de l'intoxication

Une étude épidémiologique d'intoxication par la plante *Peganum harmala* au Maroc sur 200 cas a montré que la circonstance thérapeutique occupait la première place avec 32.5 %, suivie par le suicide (28.5 %) et l'avortement (13.5 %) (**Achour et al., 2012**).

➤ **Les intoxications chez l'être humain**

Dans toutes les séries, l'intoxication survient souvent en été. C'est la période de floraison de la plante. L'ingestion de *P. harmala* entraîne plusieurs effets indésirables. Les signes neuropsychiques restent les symptômes les plus fréquents. Ils sont représentés essentiellement par les hallucinations visuelles, l'obnubilation, les vertiges, les convulsions pouvant aller jusqu'au coma profond (**Achour et al., 2012**). On retrouve notamment des troubles digestifs (douleurs épigastriques, nausées et vomissements), des troubles circulatoires (bradycardie, arythmie et hypotension artérielle), des troubles respiratoires (dyspnée, paralysie respiratoire), signes neurologiques (ataxie cérébelleuse, polyneuropathie périphérique sévère) et décès (**Ghizlane et al., 2021**). Des lésions hépatiques et une insuffisance rénale (urémie, anurie) ont également été observées (**Ghizlane et al., 2021**).

➤ **Les intoxications chez les animaux**

Les alcaloïdes de *P. harmala* sont doués de propriétés toxiques. Ils provoquent des problèmes d'empoisonnement chez les animaux notamment les chameaux et les brebis, qui mangent cette plante en grande quantité comme un fourrage dans les périodes de sécheresse. L'intoxication chez l'animal se traduit par une excitabilité, des tremblements, une rigidité musculaire, une démarche chancelante, une respiration saccadée, une hypothermie permanente, des vomissements, des maux de ventre, des hallucinations et des convulsions (**Frison et al., 2008**), en inhibant la monoamine oxydase et l'acétylcholinestérase (**Herraiz et al., 2010**). Dans la plupart des cas, les animaux intoxiqués meurent, généralement, 36 à 38 heures après l'apparition des premiers signes d'intoxication du système nerveux central et périphérique.

3.8.2. Évaluation de l'innocuité de *P. harmala* L.

Selon la fréquence et la durée de l'exposition ou l'administration du toxique, l'évaluation de la sécurité d'une substance peut être appréciée soit par l'étude de sa toxicité aiguë après administration d'une dose unique ou bien par l'étude de sa toxicité subaiguë et chronique après administration répétée de la substance.

Chapitre 3 : Présentation de la plante *Peganum harmala* L.

a. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë englobe tous les phénomènes spécifiques et les signes adresses, qui se manifestent dans un court laps de temps après administration d'une prise unique ou plusieurs prises très rapprochées d'un composé nocif (**Claverie et Hedde, 2008**). L'effet toxique aigu est généralement considéré comme un effet qui se produit immédiatement ou dans les premiers jours après l'exposition (**LeBlanc, 2010**).

La dose létale 50 (DL₅₀) une façon pratique de caractériser et classer la toxicité d'une substance. Celle-ci désigne la dose d'une substance qui peut causer la mort de 50 % d'une population animale dans des conditions d'expérimentation précises (**Lapointe, 2004**). De ce fait, la mesure de la DL₅₀ peut établir un classement pour ces substances : plus qu'elle est faible, plus que la substance est toxique et l'inverse est juste (**tableau 3**).

Tableau 3 : Échelle de la classification des substances toxiques chez les rongeurs selon Hodge et Sterner (**Hodge et Sterner, 1949**).

DL50	Indice de toxicité
Jusqu'à 1 mg/kg	Extrêmement toxique
1 à 50 mg/kg	Hautement toxique
50 à 500 mg/kg	Modérément toxique
500 à 5000 mg/kg	Légèrement toxique
5000 à 15000 mg/kg	Presque pas toxique
Plus de 15000 mg/kg	Relativement inoffensive

Cependant, la DL₅₀ a une valeur très limitée, car il ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions. Il s'agit d'une appréciation grossière et préliminaire (première analyse) qui peut être influencée par plusieurs facteurs tels que l'espèce animale, le sexe, l'âge, le moment de traitement, etc. (**Lapointe, 2004**).

b. La toxicité à long terme

Certains effets néfastes peuvent prendre plusieurs semaines ou de nombreuses années avant d'être diagnostiqués et éventuellement se révéler irréversibles (exemple : neurotoxicité de l'hexane). L'évaluation de la toxicité aiguë d'une substance ne permet pas de prédire ce type de toxicité. Des études destinées à évaluer la toxicité subaiguë et chronique doivent donc être effectuées (**Reichl, 2004**).

Chapitre 3 : Présentation de la plante *Peganum harmala* L.

➤ **La toxicité subaiguë**

La toxicité subaiguë est la mise en évidence d'effets toxiques après l'administration répétée quotidienne ou fréquente d'une ou de plusieurs doses de la substance à tester. La durée est de 28 aux 90 jours. Elle apporte des informations sur les effets toxiques principaux d'une substance et les organes cibles concernés (**Hodgson et Cunny, 2010**).

➤ **La toxicité chronique**

Une étude de toxicité chronique a pour objectif de caractériser le profil d'une substance chez une espèce de mammifère, à la suite d'une exposition prolongée et répétée. Elle est utilisée pour décrire l'ensemble des effets cumulatifs, beaucoup plus insidieux et irréversibles, apparus après une longue période d'exposition ou d'administration de très faibles doses de l'agent nocif en question (**Hodgson et Cunny, 2010**). Ces doses sont assez petites qu'aucun effet aigu n'est manifesté, alors que la durée de l'administration forme une partie significative de vie de l'espèce mise en expérience (généralement 90 jours chez le rat et la souris).

Partie

Expérimentale

I. Matériel

1.1. Matériel végétal

Les graines de *Peganum harmala* ont été récoltées au stade de la floraison de la plante entre le mois de Mai et d'Août 2018, dans la région d'El Hammadia wilaya de Bordj Bou Arréridj (Nord-Est de l'Algérie) qui se caractérise par un climat semi-aride sec (**figure 8**). Un spécimen de référence « AB-65, 2018 » de la plante *P. harmala* L., est déposé par Pr. Boudjelal A, au Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de M'sila (Algérie). Les graines une fois récoltés nettoyées, séchées à l'air libre pendant 10 jours à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis broyées grossièrement dans un moulin électrique. La poudre résultante a été stockée jusqu'à son utilisation.



Figure 8. Les fruits et les graines de la plante *Peganum harmala* L. (Photo personnelle).

1.2. Matériel Animal

L'étude *in vivo* a été réalisée sur des souris femelles *Swiss albinos* pesant entre 20 à 30 g et sur des rats femelles *Albinos wistar* dont le poids varie entre 150 et 200 g, provenant de l'Institut Pasteur (Alger, Algérie). Les animaux ont été logés dans des cages (8 par cage) dans des conditions normales de laboratoire (12/12 h cycle lumière/obscurité, 23 ± 2 °C) et nourris avec des régimes commerciaux standards (croquettes, Ets ONAB El-Kseur, Béjaia) et de l'eau du robinet. Après une période d'adaptation de 7 jours, ils sont pesés, marqués, et soumis à jeun pendant une nuit avant le début des expérimentations.

II. Méthodes

2.1. Préparation des extraits

2.1.1. Préparation de l'extrait hydrométhanolique (EHm)

Une quantité de 50 g de la poudre végétale a été extraite trois fois par macération dans 1 L de mélange hydroalcoolique (méthanol/eau, 85 %) à une température ambiante pendant 72 h (Markham, 1982).

2.1.2. Préparation de l'extrait aqueux (EAq)

Une macération a été faite avec 50 g de poudre de graines dans 500 ml d'eau distillée tiède pendant 3 jours (Mbiantcha *et al.*, 2011).

2.1.3. Préparation de l'extrait hydroéthanolique (EHe)

L'EHe a été préparé à partir d'un mélange de cinquante grammes de poudre de graines de *P. harmala* dans 200 ml d'éthanol (80 %), le mélange a été agité pendant 8 h à température ambiante.

2.1.4. Préparation de l'extrait de décoction (EDc)

La décoction a été préparée à partir d'un mélange de 50 g de matière végétale avec 200 ml de l'eau distillée (100°C) pendant 20 min (Arrear, 2013).

Tous les extraits ont été filtrés sur papier filtre Whatman et évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif 'BÜCHI' sous vide à 40°C. Les extraits obtenus sont séchés puis stockés à température de 4°C jusqu'à leurs utilisations.

2.2. Dosage phytochimique

2.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux présent dans les extraits de *P. harmala* L. a été mesuré par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007). Le réactif de folin est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). L'oxydation en milieu alcalin de ce réactif par les groupements oxydables des composés phénoliques conduit à la formation d'un mélange d'oxyde bleu. L'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits de la plante (Georgé *et al.*, 2005).

100 µl de dilution appropriée d'extrait ou de standard ont été mélangés avec 500 µl de réactif de Folin-Ciocalteu (dilué au 1/10 dans de l'eau distillée). Après 4 min d'incubation, 400 µl de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) (7.5 %) est ajoutée au milieu réactionnel. Le mélange a été maintenu à température ambiante dans l'obscurité pendant 2 h, l'absorbance a été mesurée contre un blanc à 765 nm. A partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0-160 µg/ml) (**annexe**), la teneur en composé phénolique a été calculée et exprimée en µg d'équivalent acide gallique par mg d'extrait sec (µg EAG/mg ES).

2.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantité de flavonoïdes dans les extraits a été déterminée par la méthode colorimétrique de trichlorure d'aluminium (AlCl_3) (**Bahorun et al., 1996**) dont le principe est basée sur la formation d'une liaison covalente entre le AlCl_3 et les groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes en produisant un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 430 nm. 500 µl de chaque extrait ou standard ont été ajoutés à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2 % dans le méthanol). L'absorbance a été lue à 430 nm après 10 min d'incubation. La concentration des flavonoïdes dans les échantillons a été calculée à partir d'une gamme d'étalonnage de quercétine (0-30 µg/ml) (**annexe**) et les résultats ont été exprimés en µg d'équivalent quercétine par mg d'extrait sec (µg EqQ/mg ES).

2.2.3. Dosage des flavonols

Les flavones et les flavonols dans les extraits de graines de *P. harmala* ont été déterminés selon la méthode de **Kosalec et al. (2004)**. 0.5 ml de solution d'extrait ou de standard a été mélangé avec 1.5 ml d'éthanol et 0.1 ml de solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 10 %, puis 0.1 ml d'acétate de sodium et 2.8 ml d'eau distillé ont été ajoutés et incubés pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 415 nm. La concentration des flavones et flavonols a été calculée à partir d'une gamme d'étalonnage de la quercétine (0-100 µg/ml) (**annexe**). Les résultats ont été exprimés en µg d'équivalent quercétine par mg d'extrait sec (µg EqQ/mg ES).

2.3. Étude de la toxicité de *Péganum harmala*

2.3.1. Toxicité aiguë

Pour déterminer les valeurs de DL_{50} , sept lots de souris (8 souris/lot) sont pré-jeûnés pendant 16 h, puis chacun est traité par voie orale avec une dose unique d'EHm de *P. harmala* : 2000-800-500-300-200-70 mg/kg de poids corporel.

En parallèle, un groupe contrôle de huit souris a été traité avec le véhicule (4 % DMSO dans l'eau distillée) (**Rasekh et al., 2010**). La valeur de DL₅₀ a été déterminée à l'aide du logiciel OriginPro 2015.

a. Observations cliniques

Le comportement général des souris a été observé en continu pendant la première heure suivant l'administration, périodiquement pendant les premières 24 heures (avec une attention particulière pendant les 4 premières heures) puis observée quotidiennement pendant 14 jours. Tous les changements de comportement ont été observés au cours de cette période, et la mortalité et les signes de toxicité ont été rapportés. Tous les paramètres tels que le régime alimentaire et le poids corporel ont été enregistrés au départ et tous les 7 jours par la suite pendant la période d'étude. Les observations ont été faites en notant les réactions des animaux et divers signes de toxicité (agressivité, locomotion anormale, diarrhée, etc.).

b. Poids relatif des organes

Après le sacrifice des animaux, les organes (foie, rate, reins et cœur) ont été rapidement prélevés, lavés et pesés individuellement. Le poids relatif des organes de chaque animal a été calculé en rapportant le poids absolu des organes (g) et le poids corporel (g) de l'animal le jour du sacrifice en utilisant la formule suivante : $Pr = (Po/Pc)$
Où : Pr : poids relatif ; Po : poids de l'organe (g) ; Pc : poids corporel de souris (g).

c. Examens histologiques

Les reins et les foies récupérés ont été rincés, pesés et fixés dans le formol à 10 %. Les différents organes sont coupés en petits morceaux puis déshydratés par passage dans trois bains successifs d'éthanol de 8 h à 16 h (70-75°, 90-95° et 100°) pendant 30 min. Ensuite ils sont éclaircis pendant 20 min dans deux bains de xylène et finalement inclus dans deux bains de paraffine successifs à 60°C pendant quelques heures chacun.

L'inclusion définitive est ensuite réalisée dans des moules métalliques contenant de la paraffine fondue par chauffage à 60°C. Après refroidissement, les blocs obtenus sont coupés par un microtome (LEICA RM 2145). Les coupes de 4 µm d'épaisseur obtenues sont étalées sur des lames et séchées pendant 1 h à 37°C pour être réhydratées et colorées à l'hématoxyline-éosine. Les coupes histologiques sont préparées au niveau du laboratoire d'anatomopathologie de l'hôpital BOUZIDI Lkhdhar Bordj Bou Arreridj sous la direction de Dr. TAIBI Sihem. Les lames ont été examinées à l'aide d'un microscope Optika B-500BPL (10x et 40x) pour observer les changements histopathologiques (**Martey et al., 2010**).

2.3.2. Étude de la toxicité chronique

a. Traitement des animaux

Dans le but de rechercher les organes et les fonctions touchés par l'EHm administrés quotidiennement durant une période de 90 jours, des rats albinos *Wistar* ont été répartis en quatre groupes de huit animaux selon l'homogénéité de leurs poids. L'EHm de *P. harmala* est dissous dans une solution aqueuse de DMSO à 4 % et administré quotidiennement par gavage pendant 12 semaines.

Groupe C : a servi de contrôle et a reçu 1 ml d'une solution de DMSO à 4 %.

Groupe D1 : a reçu 1ml de l'EHm (100 mg/kg PC).

Groupe D2 : a reçu 1ml de l'EHm (200 mg/kg PC).

Groupe D3 : a reçu 1ml de l'EHm (300 mg/kg PC).

Au cours de la période de traitement, les rats ont été surveillés afin de détecter les changements de comportement. Le poids corporel a été enregistré avant le traitement (jour 0) et chaque semaine pendant toute la période d'étude.

b. Prélèvement sanguine, analyses hématologique et biochimique

A la fin de chaque mois d'expérimentation le sang des rats a été collecté dans deux tubes :

- tube EDTA pour l'analyse des paramètres hématologiques : la numération des globules rouges (GR), la numération des globules blancs (GB), l'hémoglobine (Hb), l'hématocrite (Hc) et les plaquettes (PLT) en utilisant un automate Coulter (Medonic M Series- Hematology Analyzer),

- tube héparine a été centrifugé à 3000 rpm/min à 4°C pendant 10 min pour obtenir le sérum réservé à l'analyse des paramètres biochimiques (ASAT, ALAT, PAL, créatinine et urée) en utilisant des kits commerciaux (Spinreact, Spain).

c. Prélèvement des organes et examen histopathologique

A la fin de l'étude tous les animaux sont sacrifiés, les organes prélevés (le foie, les reins, les poumons, la rate, l'estomac et le cœur) lavés et pesés. Le foie et les reins sont fixés dans le formol à 10 %, déposés dans des cassettes pour un examen histopathologique (Martey *et al.*, 2010). L'analyse des différents organes (foie et reins) a été réalisée à l'aide d'un microscope Optika B-500T I-5 (10x et 40x) afin de vérifier les changements histopathologiques.

2.4. Etude de l'activité antioxydante *in vitro*

2.4.1. Activités antiradicalaires

a. Piégeage du radical DPPH

Le pouvoir antiradicalaire ou l'effet scavenger sur le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) est une méthode indirecte qui est initialement utilisée pour déterminer les donneurs de protons dans les composés naturels. Dans ce test l'antioxydant réduit le diphényl picryl-hydrayl violet en un composé jaune (le diphényl picryl-hydrazine), dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration des antioxydants présents dans le milieu (Sanchez Moreno, 2002).

Un volume de 375 µl d'extrait ou de standard (l'hydroxytoluène butylé : BHT) à différentes concentrations est mélangé avec 125 µl d'une solution méthanolique de DPPH (0.004 %) (Burits et Bucar, 2000). Après 30 min d'incubation dans l'obscurité, l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH a été calculé selon l'équation suivant :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_c - A_t)/A_c] \times 100$$

Où : A_c est l'absorbance de la solution du DPPH (contrôle négatif) ; A_t est l'absorbance de l'échantillon. La concentration inhibitrice de 50 % du DPPH (IC_{50}) de chaque extrait est calculée et exprimée en µg/ml et comparée avec celle du BHT.

b. Piégeage du radical ABTS^{•+}

Le pouvoir antioxydant vis à vis du radical ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3 éthylbenzothiazoline-6-sulfonate)) est estimé suivant la méthode de Re *et al.* (1999). Le test de piégeage du radical ABTS^{•+} est basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS^{•+} de coloration bleu foncé en ABTS incolore.

Le mélange réactionnel d'ABTS a été préparé par solubilisation de l'ABTS (7 mM) et du persulfate de potassium (2.45 mM). La solution résultante est réfrigérée pendant 16 h puis diluée pour atteindre une absorbance de 0.700 ± 0.02 nm à 734 nm. Les extraits ou standard (100 µl) à différentes concentrations est homogénéisé avec 1.9 ml de solution d'ABTS, incubés pendant 7 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 734 nm. La capacité de l'extrait à piéger le radical ABTS a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité de piégeage ABTS (\%)} = (A_c - A_t)/A_c \times 100$$

Où : A_c est l'absorbance du contrôle et A_t est l'absorbance de l'échantillon.

Le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) a été utilisé comme contrôle positif, et les résultats ont été exprimés en $\mu\text{mol g}^{-1}$ de capacité antioxydante équivalente de Trolox (CAET).

2.4.2. Pouvoir réducteur ferrique

Ce test consiste à évaluer l'aptitude des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe ferricyanure de potassium (de couleur jaune) en fer ferreux (Fe^{2+}). Cette réaction se manifeste par l'augmentation de la densité de la couleur du milieu réactionnel du jaune au vert bleuâtre du ferricyanide de potassium qui peut être quantifié à 700 nm (**Gholivand *et al.*, 2010**). Une absorbance élevée indique que le composé possède un grand pouvoir réducteur.

Le pouvoir réducteur des extraits de graines de *P. harmala* est mesuré selon le protocole décrit par **Oyaizu (1986)**. 250 μl de différents extraits ou de l'antioxydant standard (l'hydroxyanisole butylé : BHA) à différentes concentrations sont mélangés avec 250 μl d'une solution tampon phosphate (0.2 M, pH 6.6) et 250 μl d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 %). Le mélange réactionnel est incubé à 50°C pendant 20 min dans un bain-marie. 250 μL d'acide trichloracétique (TCA) à 10 % est ajouté pour arrêter la réaction, et le mélange a été centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 min. Enfin, 250 μl de surnageant est mélangée avec 250 μl de l'eau distillée et 100 μl d'une solution aqueuse de chlorure ferrique FeCl_3 (0.1 %). La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm contre un blanc. Les résultats permettent de calculer la concentration effectrice (EC_{50} $\mu\text{g/ml}$), qui représente la concentration en antioxydant nécessaire pour obtenir une absorbance de 0.5.

2.4.3. Test de blanchissement de β -carotène

La capacité des extraits à prévenir le blanchissement du β -carotène a été étudiée par le test au β -carotène/acide linoléique (**Dapkevicius *et al.*, 1998**). Cette méthode est basée sur l'oxydation de l'acide linoléique par les espèces réactives de l'oxygène qui permet de générer des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres oxydent le β -carotène, molécule hautement insaturée, ce qui provoque la rupture de ses doubles liaisons (C=C), et par conséquent la disparition de sa couleur rouge qui peut être inhibée en présence d'un autre antioxydant dans ce mélange. Cette décoloration est suivie par spectrophotomètre à 490 nm.

Une émulsion β -carotène-acide linoléique a été préparée par solubilisation de 0.5 mg de β -carotène dans 1 ml de chloroforme, puis 25 μ l d'acide linoléique et 200 mg de Tween 20 sont ajoutés au mélange. Le chloroforme a été complètement évaporé à 40°C en utilisant un rotavapor. Un volume de 100 ml d'eau distillée saturée d'oxygène est ajouté au mélange sous agitation vigoureuse. Enfin, 2.5 ml de ce mélange réactionnel ont été distribués dans des tubes à essai, et 350 μ l de chacun des extraits préparés (2 mg/ml) ont été ajoutés, et le système d'émulsion a été incubé jusqu'à 48 h dans l'obscurité à température ambiante.

Le BHT (2 mg/ml) a été utilisé comme contrôle positif, le méthanol et l'eau distillée comme contrôles négatifs. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydants a été mesurée à 490 nm pendant 48 h d'incubation (après : 1 heure, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 24 h et 48 h). Le pourcentage de l'activité antioxydante (% AA) a été calculé comme suit :

$$AA\% = (\text{Abs}_{\text{test}} / \text{Abs}_{\text{emu}}) \times 100$$

Où : **Abs_{Test}** : l'absorbance en présence des extraits ou standards au temps 0 ; **Abs_{emu}** : l'absorbance de l'émulsion à t=0. Les valeurs de % AA sont calculées après 24 h et les résultats sont exprimés en IC₅₀ (la concentration nécessaire pour inhiber 50 % du blanchiment β -carotène).

2.4.4. Capacité antioxydante totale

La technique est basé sur la réduction de Mo(VI) en Mo(V) par l'extrait et la formation d'un complexe phosphate vert/Mo (V) à pH acide. Un volume de 0.3 ml de chaque extrait ou de l'acide ascorbique a été mélangé avec 3 ml de solution réactif (0.6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Le mélange est incubé dans un bain-marie à 95°C pendant 90 min. L'absorbance de la solution a été mesurée à 695 nm après refroidissement contre un blanc (**Prieto et al., 1999**). La capacité antioxydante totale est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide ascorbique (0-250 μ g/ml) (**annexe**) et est exprimée en μ g équivalent d'acide ascorbique par milligramme d'extrait (μ g EAA/mg Ext). L'activité de l'extrait est comparée à celle d'un contrôle positif (BHT).

2.4.5. Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des extraits de *P. harmala* est mesurée en utilisant la méthode de **Decker et Welch (1990)** modifiée par **Le et al. (2007)**. La méthode est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrozine après le traitement des échantillons avec les ions Fe²⁺. Un volume de 500 µl de différentes concentrations des extraits ou de standard sont initialement mélangées avec 100 µl de FeCl₂ (0.6 mM dans l'eau distillée) et 900 µl de méthanol. Après 5 min d'incubation, 100 µl de ferrozine (5 mM) est ajouté au milieu réactionnel. Le mélange est bien agité puis laissé réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la complexation du fer résiduel et la formation d'un chromophore rouge (Fe(II)-Ferrozine) ayant une absorbance maximale à 562 nm contre un blanc. L'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) est utilisé en tant que chélateur de référence. L'activité chélatrice des extraits vis-à-vis du fer est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité de chélation (\%)} = [(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test}) / \text{Abs contrôle}] \times 100$$

Une valeur IC₅₀ est définie comme la concentration d'inhibition de l'extrait testé, qui produit 50 % de l'effet de piégeage maximal.

2.5. L'activité antioxydante *in vivo*

a. Traitement des animaux

Des rats albinos *Wistar* ont été répartis en cinq groupes de huit animaux.

Groupe C : a servi de contrôle et a reçu une solution de DMSO (4 %).

Groupe D1 : a reçu 1 ml de l'Ehm (100 mg/kg PC).

Groupe D2 : a reçu 1 ml de l'Ehm (200 mg/kg PC).

Groupe D3 : a reçu 1 ml de l'Ehm (300 mg/kg PC).

Groupe Vit C : a reçu 1ml de la Vit C (100 mg/kg).

L'Ehm de *P. harmala* et la vitamine C sont dissous dans le DMSO (4 %) et administré aux rats quotidiennement par gavage pendant 12 semaines.

b. Prélèvement du sang

Le sang des rats a été obtenu par ponction rétro-orbitaire à l'aide de tubes capillaires et collecté dans des tubes héparine puis centrifugé à 3000 rpm/min à 4°C pendant 10 min pour obtenir le sérum qui a été réservée pour l'analyse de l'activité antioxydante à l'aide du test de piégeage DPPH et le test de pouvoir réducteur.

c. Prélèvement et préparation d'homogénats du foie

A la fin de l'expérimentation tous les rats sont sacrifiés, le foie prélevé lavé et pesé, puis a été immédiatement conservé à -20°C pour le dosage des paramètres de stress oxydatif. Pour la préparation d'homogénats, le foie est coupé en petits morceaux, pesé et enfin homogénéisé à l'aide d'un homogénéisateur électrique dans une solution du KCl glacé (0.15 %, p/v) à raison de 10 %. L'homogénat a été centrifugé deux fois à 4000 tr/min pendant 10 min à 4°C. Ensuite, le surnageant a été récupéré dans des tubes secs et stocké à -20°C jusqu'à leur utilisation dans le dosage des paramètres de stress oxydant : activité de catalase (CAT), taux du glutathion réduit (GSH) et taux de malondialdéhyde (MDA).

d. Effet sur la capacité antioxydante du plasma

➤ *Activité de piégeage des radicaux DPPH du plasma*

La capacité du plasma à piéger le radical DPPH a été mesurée selon la méthode de **Cuendet *et al.* (1997)** en mélangeant 25 µl de plasma avec 625 µl de la solution méthanolique de DPPH (0.004 %). Après incubation à température ambiante pendant 30 min, l'absorbance de la solution a été déterminée à 517 nm.

La capacité antioxydante plasmatique (CAP) a été ensuite calculée selon l'équation suivant : **Inhibition (%) = [(Ac - At)/Ac] x 100**

Où : **A_c** est l'absorbance de la solution du DPPH (contrôle négatif) ; **A_t** est l'absorbance de l'échantillon.

➤ *Effet sur le pouvoir réducteur du plasma*

Le pouvoir réducteur du plasma a été évalué en mesurant sa capacité à réduire Fe⁺³ en Fe⁺² selon la même procédure suivie *in vitro* (**Topçu *et al.*, 2007**).

e. Effet de l'E_Hm sur l'état redox hépatique

➤ *Estimation de l'activité de catalase (CAT)*

L'activité de l'enzyme catalase est réalisé selon la méthode de **Claiborne (1986)**, dont le principe est basé sur la propriété de cette enzyme à dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en H₂O et O₂. L'activité de cette enzyme est mesurée par analyse spectrophotométrique à 240 nm du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène en présence d'une source enzymatique (homogénat). Un volume de 50 µl de l'homogénat de chaque échantillon est mélangé avec 2.95 ml d'une solution de H₂O₂ (19 mM dans le tampon phosphate de potassium pH 7.4 (0.1 M)). La diminution de l'absorbance est suivie pendant deux minutes à des intervalles de 30 secondes.

L'activité enzymatique est calculée en utilisant le coefficient d'extinction de H_2O_2 ($43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). L'activité de la catalase tissulaire est exprimée en μmol de H_2O_2 / min / mg protéine.

➤ *Estimation de taux du glutathion (GSH)*

Les taux du GSH ont été déterminés dans les homogénats du foie en utilisant le réactif d'Ellman (5, 5 0-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB). La réaction consiste à couper la molécule d'acide 5,5' dithiodis-2- nitrobenzoïque (DTNB) par le groupe sulfhydryl (-SH) du glutathion, ce qui libère un composé jaune (l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque (TNB)) lequel, à pH alcalin, présente une absorbance maximale à 412 nm (**Ellman, 1959**).

Une quantité de 25 μl d'homogénat du foie est diluée dans 5 ml de tampon phosphate (0.1 M, pH 8), puis 1.5 ml de mélange a été ajouté à 10 μl de DTNB (0.01 M). Le mélange est incubé à une température ambiante pendant 5 min. La concentration de GSH présente dans le tissu a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction du TNB ($1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et exprimée en $\mu\text{moles/g}$ de tissu.

➤ *Estimation de taux du MDA (Malondialdéhyde)*

La teneur hépatique en MDA était un indicateur pour déterminer les niveaux de peroxydation lipidique hépatique. Le MDA est l'un des produits terminaux de la décomposition des acides gras polyinsaturés sous l'effet des radicaux libre, libérés au cours du stress oxydant. Le dosage repose sur la formation en milieu acide et chaud (100°C), entre le MDA et deux molécules de TBA, d'un pigment coloré rose absorbant à 530 nm. L'intensité de la coloration rose augmente avec la concentration de l'MDA (**Draper et Hardley, 1990**).

La méthode utilisée pour le dosage du MDA est celle d'**Okhawa et al. (1979)**. Un volume de 125 μl de TCA (20 %) et 250 μl d'acide thiobarbiturique (TBA à 0.67 %) sont ajoutés à 125 μl d'homogénat tissulaire. Le mélange est chauffé à 100°C pendant 20 min. Après refroidissement, le complexe MDA-TBA a été extrait avec 1 ml du n-butanol. La phase organique a été séparée par centrifugation à 3000 rpm pendant 15 min, l'absorbance du surnageant a été mesurée à 530 nm. La concentration du MDA est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire du produit d'addition MDA-TBA ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et exprimée en nanomoles de MDA/g de tissu.

➤ Quantification des protéines totales

Les protéines totales dans l'homogénat du foie sont dosées selon la méthode de Biuret en utilisant le Kit (Spinreact S.A.U E-17176). Le principe de ce test est basé sur la complexation entre les protéines et les sels de cuivre pour donner un complexe violet-bleu intense en milieu alcalin (**koller, 1984**). Un volume de 1 ml de ce réactif est mélangé avec 25 µl d'homogénat, le mélange est incubé 5 min au bain-marie à 37°C. Les absorbances sont mesurées à 540 nm et la quantité de protéines dans l'échantillon est exprimée en mg/dl. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration en protéines totales dans l'échantillon.

2.6. Étude de l'activité antiproliférative

2.6.1. Lignées cellulaires et conditions de culture

Des cellules *HeLa* (lignée de cancer du col de l'utérus, adhérente) ont été utilisées pour étudier l'effet cytotoxique des extraits de *P. harmala*. Cette partie d'étude a été effectuée dans le laboratoire d'analyse, de valorisation et de sécurité alimentaire, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax, Tunisie, et la lignée cellulaire nous a été aimablement fournie par le **Dr Riadh Ben Mansour**.

Les cellules ont été cultivées dans le milieu RPMI 1640 (Gibco). Ce dernier est complété par 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal et 2 mM de L-glutamine avec 400 µL d'antibiotique (50 U/ml de gentamycine et de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine) (Sigma). Les cultures ont ensuite été maintenues à 37°C dans un incubateur à 5 % de CO₂ et saturées de vapeur d'eau à 95 %. Le milieu a été changé tous les jours et 0.05 % d'EDTA-trypsine est utilisé pour remettre en suspension les cellules lorsqu'une confluence atteint 80 %. Le milieu de culture a été renouvelé 24 h après culture puis toutes les 48 h.

2.6.2. Test au bleu de trypan « Comptage des cellules »

Après 24 h, les cellules ont été recueillies et leur nombre a été compté dans l'hémocytomètre par le test d'exclusion au bleu de trypan (**Cimino et al., 2014**). Un volume de 50 µl de la suspension cellulaire a été prélevé et mélangé avec un volume égal de solution de bleu de trypan (colorant vital qui ne colore que les cellules mortes) et la viabilité cellulaire a été déterminée en comptant les cellules non colorées sous microscopie inversée. Selon la formule suivante, le nombre de cellules est déterminé :

Nombre de cellules/ml = (Nombre de cellules par carré x le facteur de dilution) x 100

2.6.3. Test de MTT

L'activité antiproliférative et cytotoxique des extraits contre les lignées cellulaires *HeLa* a été évaluée *in vitro* par la méthode de **Mosmann (1983)** en utilisant le réactif MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium). Les cellules *HeLa* ont étéensemencées (densité 4.44×10^5 cellules/puits) dans des plaques de culture cellulaire à 96 puits. Après confluence, les cellules ont reçu un traitement avec le milieu additionné de 10 μ l d'extrait. Un milieu (RPMI 1640) sans extrait a été utilisé comme contrôle, et les cellules ont été encore cultivés pendant 48 h. 10 μ l de solution de MTT (1 mg/ml) est ajouté puis incubé pendant 4 h à 37°C dans un incubateur à CO₂.

Un volume de 180 μ l du milieu a été retiré de chaque puits sans perturber les amas cellulaires. Les cristaux de formazan ont été dissous en utilisant 180 μ l de solution de méthanol/DMSO (50:50 V/V) et les plaques ont été soigneusement mélangées sur un agitateur à plaques pendant 30 min à température ambiante avec la cellule contenant les cristaux de formazan. Enfin, après la dissolution de tous les cristaux, l'absorbance de chaque puits a été déterminée avec un lecteur de microplaques (ELx 800) à 570 nm. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire et calculés selon la formule suivante : **% d'inhibition = 100 - % de viabilité**

Le pourcentage de viabilité cellulaire est déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Viabilité cellulaire} = (\text{DO}_{\text{extrait}} \times 100) / \text{DO}_{\text{control}}$$

La concentration d'inhibition à 50 % (IC₅₀) a été déterminée comme étant les concentrations de l'extrait qui ont réduit le nombre de cellules de 50 % dans les cultures traitées par rapport aux cultures non traitées.

2.7. Activité anti-inflammatoire

2.7.1. Évaluation de l'effet anti-inflammatoire *in vitro*

L'effet anti-inflammatoire *in vitro* des extraits de *P. harmala* est déterminé à l'aide du test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine du sérum bovin (BSA) (**Williams et al., 2008**). Brièvement, 500 μ l de la solution aqueuse de BSA à 0.2 % préalablement préparée dans un tampon Tris-HCl (20 mM, pH 6.8) sont ajoutés à 500 μ l de chaque extrait ou de Diclofénac (l'anti-inflammatoire de référence) à différentes concentrations. Le contrôle est composé de 500 μ l de la solution aqueuse de BSA et 500 μ l d'eau distillée. Ce mélange est incubé à 37°C pendant 20 min, puis à 65°C pendant 10 min. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 660 nm et le pourcentage d'inhibition est calculé à l'aide de l'équation suivante : **% inhibition = [(Abs_{contrôle} - Abs_{test}) / Abs_{contrôle}] x 100**

2.7.2. Évaluation de l'effet anti-inflammatoire *in vivo*

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire *in vivo* des extraits de *P. harmala*, l'effet anti-œdémateux est induit par le xylène selon la méthode de **Rotelli et al. (2003)**. Les souris des groupes traités ont reçu 200 mg/Kg/PC des extraits de *P. harmala* et 100 mg/Kg/PC de diclofénac, par voie orale une heure avant l'induction de l'œdème, tandis que les souris dans le groupe contrôle reçoivent 1 ml de solution de NaCl (0.9 %).

L'œdème de l'oreille est induit par l'application topique de 30 µL de xylène sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris des six groupes. Une heure après l'induction de l'inflammation, toutes les souris ont été sacrifiées, des disques auriculaires de 0.5 cm de diamètre ont été retirés et le poids des deux oreilles a été mesuré. La différence de poids d'œdème de l'oreille droite et gauche après l'application de xylène est calculée et le pourcentage d'inhibition de l'œdème est défini par rapport au groupe contrôle selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\Delta_{\text{contrôle}} - \Delta_{\text{traité}} / \Delta_{\text{contrôle}}) \times 100 ; \Delta = \text{poids de l'œdème.}$$

2.8. Activité antiarthritique de l'Ehm

2.8.1. Induction de l'arthrite par le collagène type II chez les rats

L'arthrite a été induite chez des rats *Wistar* femelles selon la méthode décrite par **Arrar et al. (2013)** par l'injection intra-dermique de collagène II (CII). Une épilation du dos des rats à la base de la queue est effectuée. L'induction de l'arthrite chez les rats de différents groupes est comme suit :

❖ **Le jour 1** : une immunisation des rats après anesthésie (groupes 02, 03, 04, 05, 06 et 07) est effectuée par une injection intradermique à la base de la queue en quatre points sur le dos avec 100 µl de solution de CII (3 mg/mL dans 0.1 M d'acide acétique pour 24 h à 4°C) émulsionné dans le même volume d'adjuvant complet de Freund (ACF).

❖ **Le jour 07** : après la première immunisation, une seconde immunisation de rappel de 100 µL de CII (2 mg/ml dans l'acide acétique 0.1 M) émulsionné dans le même volume d'adjuvant incomplet de Freund a été injectée de la même manière.

2.8.2. Traitement préventif et curatif des rats arthritiques par l'Ehm

Pour l'étude des effets préventifs et curatifs de l'Ehm de *P. harmala*, les rats sont répartis en sept groupes et le traitement effectué quotidiennement :

- Groupe 1 : groupe contrôle normal (GCN), injecté d'acide acétique (0.1 M, 200 µL) et non traité, a reçu 1 ml d'eau distillée par gavage de 1^{er} jour jusqu'au jour 40,

- Groupe 2 : groupe contrôle arthritique (GCA), injecté par le CII et non traité, a reçu par gavage, 1 ml d'eau distillée de 1^{ère} jour jusqu'au jour 40,

- Groupes 3 et 4 : groupes préventives, immunisés par CII et reçu quotidiennement par gavage 1 ml d'une solution de l'Ehm à 50 mg/kg PC/j (groupe 3) et 100 mg/kg PC/j (groupe 4), le traitement a commencé le jour de l'induction de l'arthrite (jour 0) jusqu'au 21^{ème} jour.

- Groupes 5 et 6 : groupes curatif, immunisés avec CII et reçus par voie orale 1 ml d'une solution d'Ehm à 50 mg/kg PC/j (groupe 5) et 100 mg/kg PC/j (groupe 6), le traitement a été initié le jour de l'installation de l'arthrite (14^{ème} jour) et s'est poursuivi quotidiennement jusqu'au 40^{ème} jour. Il est noté que le traitement ne concerne que les rats présentant des signes d'arthrite.

- Groupe 7 : groupe de référence (GRf) injecté avec CII et reçu, par gavage, 1 ml d'une solution de Diclofinac (50 mg/kg PC/j), du 14^{ème} jusqu'au 40^{ème} jour.

2.8.3. Évaluation du développement de l'arthrite

Les rats ont été examinés quotidiennement pour la recherche des signes d'arthrite caractérisés par un œdème et/ou un érythème des pattes. Le poids corporel a été mesuré quotidiennement à partir du jour où les premiers signes d'arthrite sont apparus. L'incidence et la sévérité de l'arthrite ont été évaluées à l'aide d'un système de notation de l'arthrite basé sur la moyenne de trois observations sur l'évolution des signes d'arthrite chez des rats immunisés. Le score total d'un animal a été calculé en additionnant les scores des quatre pattes à l'aide d'une échelle (0 à 16). L'observation des signes d'arthrite pour chaque patte est évaluée comme suite :

0 : Pas de gonflement ou de rougeur des jambes ; aucun changement,

1 : Un gonflement et rougeur dans un type d'articulation,

2 : Un gonflement et rougeur dans 2 types d'articulations,

3 : Un gonflement et rougeur dans 3 types d'articulations,

4 : Un gonflement et rougeur dans 4 types d'articulations.

Le score 16 est le maximum potentiel des scores arthritiques combinés par un animal.

•Prélèvement du sang

Après 40 jour de traitement, des prélèvements sanguins sont réalisés à partir du sinus rétro-orbital de l'œil à l'aide de tubes capillaires et les échantillons de sang sont récupérés dans des tubes EDTA pour la détermination de la vitesse de sédimentation des globules rouges (VS), la formule et numération sanguine (FNS), et dans des tubes secs

pour la recherche des paramètres sérologiques de l'inflammation ; dosage de la protéine C réactive (CRP).

➤ *La vitesse de sédimentation des globules rouges*

La vitesse de sédimentation (VS) est un test pratique pour l'évaluation de l'inflammation. Des échantillons du sang des groupes étaient pris dans des tubes EDTA, le sang est placé verticalement dans des tubes capillaires pendant 2 h, la vitesse à laquelle les globules rouge sédimente est mesurée, les résultats sont exprimés en mm aux première et deuxième heures (**Janssens, 2006**).

➤ *Dosage de la protéine C réactive*

La détection sérologique de la CRP a été déterminée par le test d'agglutination. Une aliquote de 50 µl de sérum non dilué a été déposée sur une lame, puis 50 µl du réactif CRP-latex (Spinreact) ont été ajoutés. Les deux gouttes sont mélangées à l'aide d'un agitateur pendant 2 min avant d'observer la présence de l'agglutination. Les contrôle positif et négatif doivent être traités de la même façon que le sérum à examiner (**Lars et al., 1997**). Si une agglutination est obtenue, une série de dilution du sérum a été réalisée : 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, avec l'eau physiologique et la même procédure est effectuée avec chacune des dilutions. Le taux sérique de la protéine C réactive est obtenu en multipliant l'inverse de la dernière dilution ayant donné une réaction positive fois le facteur de dilution.

➤ *Formule et numération sanguine (FNS)*

L'FNS ou hémogramme permet de mesurer le nombre d'éléments de chacune des trois catégories de cellules sanguines qui sont les globules rouges (hématies), les globules blancs (leucocytes) et les plaquettes. Le sang prélevé dans des tubes renfermant de l'EDTA subit une numération des différents éléments figurés du sang à l'aide d'un automate (Medonic M Series- Hematology Analyzer).

2.8.4. Les coupes histologiques

Après 40 jours, les rats sont sacrifiés sous anesthésie et les pattes postérieures et antérieures sont coupées au-dessus de la cheville et les poignets respectivement. La peau des pattes est enlevée, ensuite les pattes sont fixées dans 10 % du formol pendant une semaine, puis la décalcification est effectuée avec l'acide formique 10 % (**Amany et al., 2012**). Les fragments des pattes sont déshydratés par submersion dans des bains successifs d'éthanol 60 %, 70 %, 80 % et 100 %, puis éclaircies dans deux bains de toluène de 20 min.

Après déshydratation par l'éthanol, les échantillons subissent deux bains de xylène et deux autres de paraffine fondue. Le xylène occupe la place de l'eau et donc facilite la pénétration de la paraffine puisque cette dernière est hydrophobe. La durée de chaque bain est de 24 h. Les échantillons sont placés dans des moules et recouverts de paraffine fondue. Après refroidissement, les blocs sont prêts à la coupe. Les blocs sont placés dans le microtome afin de réaliser des coupes de 4 μm d'épaisseur.

A l'aide d'une pince très fine, les coupes sont placées sur des lames couvertes de gélatine puis déparaffinées par chauffage à l'étuve pendant une heure. Pour mettre en évidence les articulations, les coupes sont d'abord réhydratées par submersion dans les bains suivants : 2 bains de toluène (30 min) puis 5 bains successifs d'éthanol 100 %, 90 %, 80 %, 70 % et 60 % (5 min chacun). Après rinçage avec de l'eau distillée, les coupes sont placées dans un bain d'hématoxyline (8 min), l'excès de colorant est enlevé par l'acide chlorhydrique. Elles sont ensuite mises dans un bain d'éosine pour colorer le cytoplasme, l'excès du colorant est éliminé par l'éthanol. Les lames ainsi colorées sont couvertes de lamelles et sont alors prêtes à l'observation au microscope optique. L'infiltration des cellules inflammatoires et l'hyperplasie du tissu conjonctif ont été surveillées.

L'étude histopathologique est effectuée dans le service de l'anatomie pathologique du CHU- Sétif et la lecture des lames est effectuée par Dr Ghorieb Ismail spécialiste en Cytologie et Anatomie-Pathologique Bordj Bou Arréridj.

2.9. Analyses statistiques

Les résultats des différents tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD dans les tests *in vitro* et en moyenne \pm SEM dans les tests *in vivo*. Le logiciel GraphPad Prism (version 8.00) a été utilisé pour l'analyse statistique. Les données ont été analysées à l'aide du test *t* de Student et de l'analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA), suivis du test de Dunnett ou test de Tukey's pour une comparaison multiple. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives à $p < 0.01$.

III. Résultats et discussion

3.1. Analyse quantitative des composés phytochimiques

3.1.1. Rendement d'extraction

L'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation des principes actifs de la matière végétale. Elle a été effectuée à partir d'une poudre végétale en utilisant des solvants organiques (le méthanol à 85 % et l'éthanol à 80 %) et l'eau afin d'obtenir l'EHm, l'EHe, l'EAq et l'EDc.

Le calcul des rendements par rapport au poids sec de la poudre végétale de *P. harmala* a montré que l'EHm représente le rendement le plus élevé (24.88 ± 0.74 %) qui est significativement supérieur ($p < 0.01$) à celui de l'EHe (12.80 ± 0.40 %), l'EAq (12.56 ± 0.67 %) et l'EDc (10.62 ± 0.70 %). En comparaison avec les résultats des autres travaux, ces extraits donnent des rendements supérieurs à ceux obtenus par **Zainab et al. (2016)** (EHe : 12.45 ± 0.39 % et EHm : 15.84 ± 0.11 %), à l'exception de l'EAq qui présente un rendement légèrement inférieur (19.77 ± 0.16 %). Les mêmes résultats ont été obtenus par **Alani et al. (2021)** (EHe 15.6 %) et par **Singhai et Patil (2021)** (EHe : 12.45 % et EAq : 6.75 %).

L'origine et la période de récolte de l'espèce, l'organe de la plante, la durée de séchage et la méthode d'extraction ainsi que la température utilisée sont des facteurs qui peuvent affecter le rendement (**Zhang et al., 2018**). D'autre part, la polarité du solvant est l'un des facteurs qui affecte directement le rendement d'extraction (**Medjeldi et al., 2018**).

Le choix des solvants a été orienté par de nombreuses études réalisées pour trouver les conditions optimales d'extraction des polyphénols. Cette étude indique que la macération au méthanol est la meilleure technique pour extraire les polyphénols totaux et les flavonoïdes (**Bohui et al., 2018**). De même, des rapports antérieurs ont indiqué que le solvant le plus approprié pour l'extraction des composés phénoliques des plantes médicinales et aromatiques est le méthanol (**Djidel et al., 2013**). L'utilisation de mélange alcool/eau a pour but d'extraire les composés polaires ainsi que les composés de moyenne et de faible polarité.

3.1.2. Teneur en composée phénolique

➤ Teneur en polyphénols totaux

Les teneurs les plus élevées des polyphénols ont été observées dans l'EHm et l'EHe avec des valeurs de 114.14 ± 0.90 µg EAG/mg ES et 102.68 ± 0.58 µg EAG/mg ES, respectivement. Alors que, les teneurs moyennes ont été détectées dans l'EAq et l'EDc avec

des valeurs de $65.35 \pm 0.74 \mu\text{g EAG/mg ES}$ et $80.63 \pm 0.59 \mu\text{g EAG/mg ES}$, respectivement.

Selon des études antérieures, nos résultats sont similaires à ceux de **Zainab et al. (2016)** (EHe $80.52 \mu\text{g EAG/mg ES}$, EHm $30.46 \mu\text{g EAG/mg ES}$ et EAq $46.52 \mu\text{g EAG/mg ES}$). En revanche, **Senhaji et al. (2022)** montrent que l'extrait méthanolique de *P. harmala* est le plus riche en composés phénoliques ($94.37 \pm 0.62 \mu\text{g EAG/mg ES}$). La teneur en composés phénoliques dans les extraits a été influencés par leur solubilité dans les solvants et la méthode utilisée pour l'extraction (**Tanase et al., 2019**). Le méthanol était recommandé et fréquemment utilisé pour l'extraction des composés phénoliques.

➤ Teneur en flavonoïdes

Les résultats révèle que l'EHe et l'Ehm sont les plus riches en flavonoïdes avec des teneurs de $31.20 \pm 1.46 \mu\text{g EqQ/mg ES}$ et $30.33 \pm 1.06 \mu\text{g EqQ/mg ES}$, respectivement, ce qui a été presque deux fois plus élevé que celui trouvé dans l'EAq et l'EDc ($15.51 \pm 0.50 \mu\text{g EqQ/mg ES}$ et $20.45 \pm 1.06 \mu\text{g EqQ/mg ES}$, respectivement). Ces résultats sont similaires à d'autres suggérant la richesse des graines de *P. harmala* en flavonoïdes (**Kaskoos et al., 2014 ; Senhaji et al., 2022**).

➤ Teneur en flavonol

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré un niveau élevé des flavonols dans l'EHe et l'Ehm ($108.05 \pm 1.88 \mu\text{g EqQ/mg ES}$ et $95.40 \pm 0.80 \mu\text{g EqQ/mg ES}$, respectivement). Alors que, l'EDc et l'EAq présente des teneurs moyenne en flavonols ($52.81 \pm 0.87 \mu\text{g EqQ/mg ES}$ et $46.38 \pm 0.23 \mu\text{g EqQ / mg ES}$, respectivement).

3.2. Etude toxicologique

3.2.1. Toxicité aiguë

La sécurité de toute préparation à base de plantes est un problème sérieux qui doit être mis en évidence et toute bioactivité ou bienfaits médicaux revendiqués d'extraits de plantes doivent être associés à un test de toxicité qui est une étape fondamentale pour toute préparation destinée à être utilisée chez l'homme (**Jordan et al., 2010**). L'évaluation de la toxicité aiguë consiste à observer et enregistrer les différents effets toxiques qui sont, immédiatement, apparus après l'administration d'une seule dose de la substance testée (**LeBlanc, 2010**).

➤ **Changement de comportement et mortalité**

Le comportement et l'état général des souris ont été surveillés pendant 14 jours. Cette étude a révélé que la mort des souris après administration orale de l'Ehm était dose-dépendante. L'administration de l'extrait à des doses <300 mg/kg PC n'a provoqué aucun changement de comportement et aucune mortalité au cours de la période d'étude. En revanche, nous avons remarqué que les souris qui reçoivent une dose de 500- 800 et 2000 mg/kg PC montrent des changements de comportements et des signes d'intoxication (difficulté de respiration, hypoactivité, douleurs abdominales, les matières fécales humides, etc.) et entrent dans un état narcotique ce qui conduit, finalement, à leur mort. Certains effets indésirables, tels que l'hypoactivité, l'anorexie et la diarrhée ont été observés juste après l'administration orale. Le nombre de mortalité atteinte le 100 % chez les souris qui reçoivent la dose de 2000 mg/kg PC. **Frison et al. (2008)** décrivent des symptômes d'intoxication humaine et animale, par les graines de *P. harmala*, similaires à ceux observés dans le groupe qui reçoivent 2000 mg/kg (une somnolence, une anorexie et des troubles respiratoires). Ils ont rapporté que ces signes dus, probablement, à la présence des alcaloïdes β -carboliniques tels que l'Harminine et l'Harmaline, ou des dérivés quinazoliniques : Péganine et Desoxypéganine dans les graines de *P. harmala* (**Aniszewski, 2007**).

➤ **La dose létale médiane DL₅₀**

La DL₅₀ de l'Ehm a été calculé à 501.47 mg/kg PC (**figure 9**). Selon **Hodge et Sterner (1992)**, l'extrait hydrométhanolique de graines de *P. harmala* (50 < DL₅₀ < 500 mg/kg), peut être classé dans la catégorie des produits chimiques modérément toxiques. La valeur de la DL₅₀ de l'Ehm étaient presque similaires à ce qui a été trouvé par **Gseyra (2006)** (DL₅₀ : 290 mg/kg). Selon **Abbas et al. (2021)**, l'extrait méthanolique de *P. harmala* n'était pas toxique au cours d'un essai de toxicité aiguë de 14 jours lorsqu'il était administré à une dose de 3 g/kg. Les mêmes résultats sont trouvés par **Rezzagui et al. (2020)**.

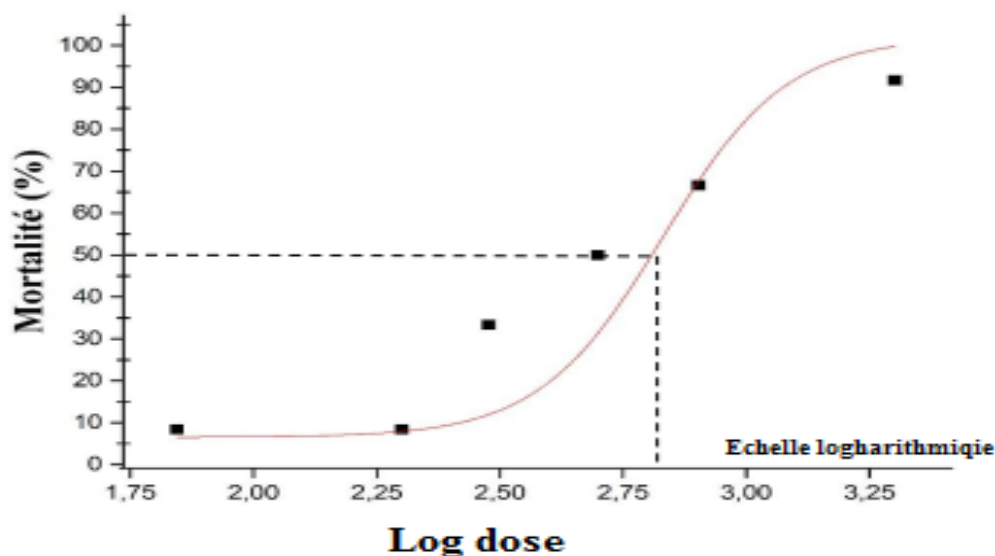


Figure 9. Courbe dose-mortalité pour l'Ehm de *P. harmala* chez les souris (doses orales uniques). DL₅₀ calculée = 501.47 mg/kg PC.

➤ Observations cliniques et évolution pondérale

L'évolution pondérale des souris est l'un des paramètres directement liés à la toxicité. Les groupes traités avec les doses de 70, 200 et 300 mg/kg avaient un poids corporel normal (pas de diminution significative $p > 0.05$) pendant tout la période de l'étude par rapport au groupe contrôle. Cependant, les groupes recevant les doses de 500 et 800 mg/kg ont montré une réduction significative de la masse corporelle en fonction de la dose ($p < 0.01$) au cours de la même période (**figure 10**). L'extrait peut avoir retardé la croissance de l'animal, la diminution du poids corporel peut refléter une croissance anormale des souris causée par le métabolisme altéré des souris (**Mukinda et Eagles, 2010**). **Abbas et al. (2021)** ne révèlent aucune toxicité, aucun changement de poids corporel, aucun changement de comportement et aucune mortalité chez les animaux au cours d'un essai de 14 jours d'évaluation de la toxicité aiguë lorsque l'extrait a été administré à une dose de 3 g/kg.

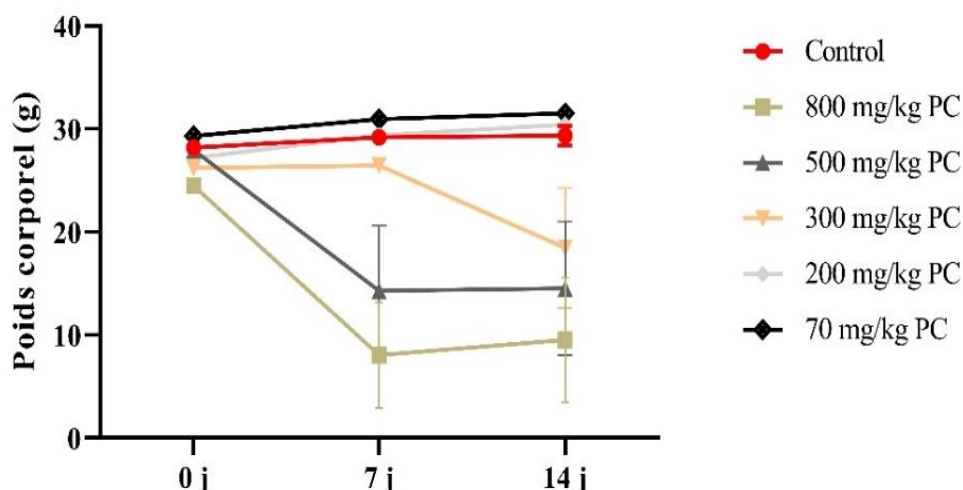


Figure 10. Poids corporel des souris de groupe contrôle et les souris des groupes traitées par voie orale avec l'EHm de *P. harmala* L. Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM.

➤ **Masses relatives des organes**

Le poids des organes est une indication importante de l'état pathologique et physiologique des animaux. Après l'administration orale de l'EHm on a observé que la taille, la forme, la couleur ainsi que le poids des organes vitaux (reins, foie, rate et cœur) des souris de tous les groupes sont tout à fait normaux. Ceci est bien élucidé après la détermination de la valeur de la masse relative pour chaque organe. Toutes les valeurs sont comparables à celles obtenues chez le contrôle (**figure 11**). Cela impliquait que l'EHm à 800 mg/kg ne posait aucune menace pathologique pour les organes vitaux comme le foie, les reins, la rate et le cœur.

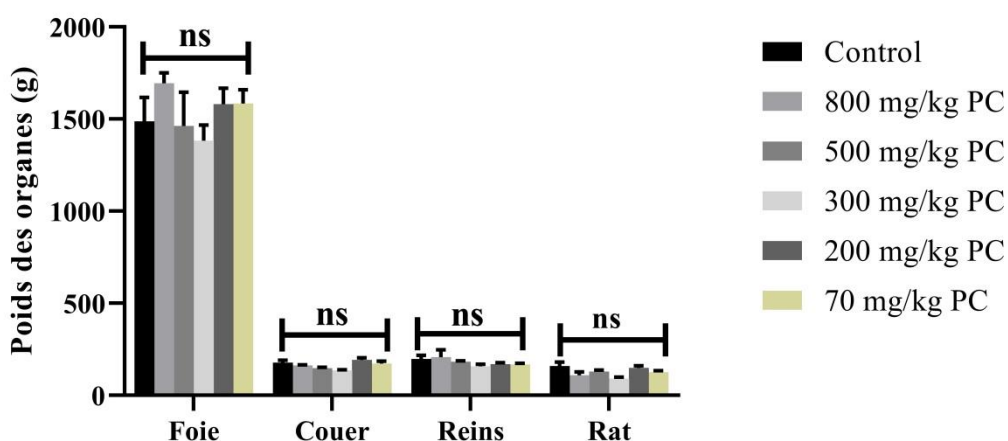


Figure 11. Poids relatif des organes des souris traitées avec l'EHm de *P. harmala* et les souris de groupe contrôle. Valeurs exprimées en moyenne \pm SEM. (ns) pas de différence significative par rapport au groupe contrôle.

➤ Histopathologie du foie et des reins

Après l'examen macroscopique du foie et des reins prélevés, aucune modification n'a été observée au niveau de la taille, la forme et du poids. L'histopathologie du foie des souris traitées avec l'Ehm (300, 200, 100 et 70 mg/kg PC) par rapport au contrôle a permis de constater la conservation de l'architecture cellulaire, cependant quelques particularités ont été enregistrées.

Une congestion vasculaire à été observé dans certains tissus (500 et 800 mg/kg PC). Une telle congestion pourrait être due à l'action vasodilatatrice de l'Ehm sur la paroi des vaisseaux sanguins (Ashley, 2004). L'infiltration leucocytaire présente dans le foie des groupes traités avec la dose de 500 et 800 mg/kg pourrait être le résultat d'une inflammation du foie.

Les résultats de l'examen histologique du rein des souris traitées (70 mg/kg PC) n'ont révélé aucune modification structurelle et aucune altération architecturale (lobulaire et tubulaire) par rapport au contrôle, à l'exception de la présence d'une congestion glomérulaire et médullaire dans certains tissus de souris traitées par l'Ehm de *P. harmala* (800 mg/kg PC) (figure 12). Les résultats obtenus démontrent que l'Ehm de *P. harmala*, n'ont provoqué aucune détérioration au niveau des organes vitaux (foie et reins) confirmés précédemment par les paramètres biochimiques. Abbas *et al.* (2021), ont trouvé que les observations microscopiques n'ont révélé aucun changement histopathologique substantiel chez les rats traités par l'extrait méthanolique de *P. harmala* par rapport à ceux du contrôle.

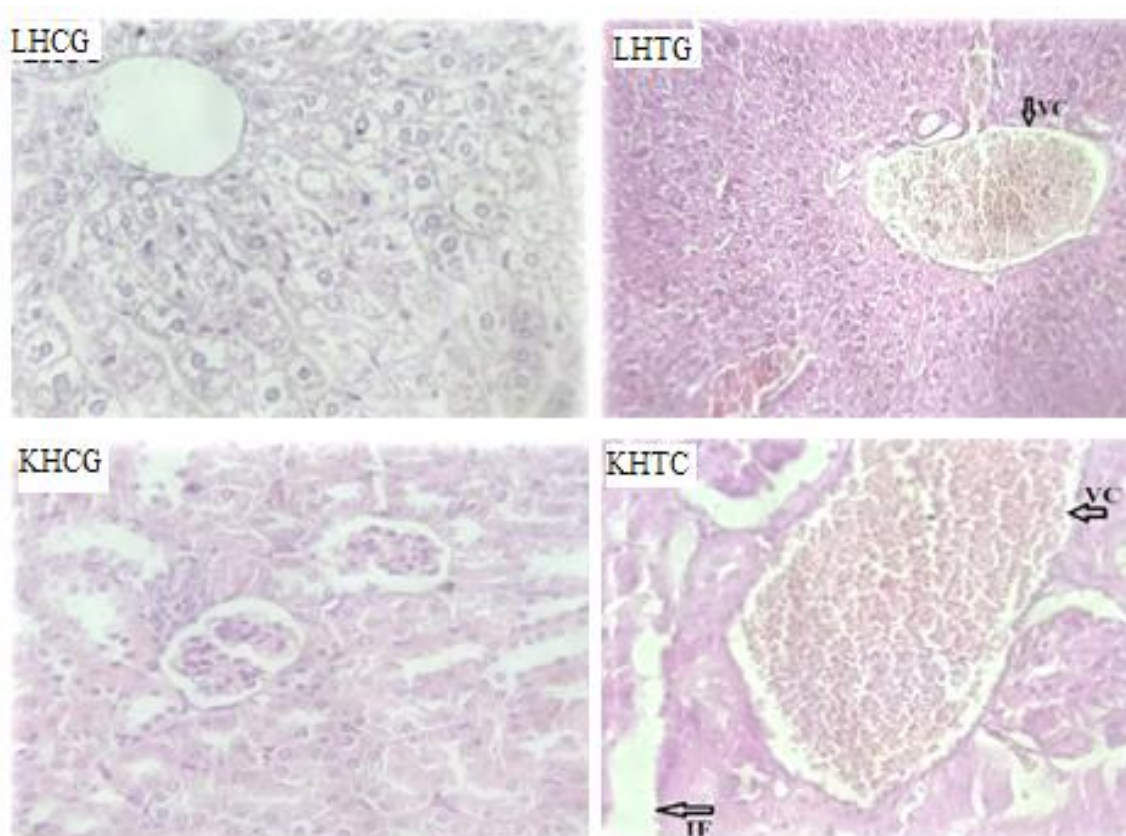


Figure 12. Coupes histopathologique du foie et des reins des souris contrôle et des souris traités avec l'EHm de *P. harmala* L. en toxicité aiguë (x 40). CV : Congestion vasculaire, IF : infiltrat inflammatoire. LHCg : Groupe contrôle histologie hépatique ; LHTg : groupe de test d'histologie hépatique ; KHCG : groupe contrôle histologie rénale ; KHTG : groupe test d'histologie rénale.

3.2.2. Toxicité chronique

Dans cette étude, des rats ont été traités avec l'EHm de *P. harmala* pendant 90 jours consécutifs par voie orale a fin de rechercher une éventuelle signes cliniques et/ou biologiques d'intoxication.

➤ Changement de comportement et mortalité

L'administration de doses de 100, 200 et 300 mg/kg PC de l'EHm de *P. harmala* aux rats n'a causé aucun changement de comportement et aucun cas de mortalité chez les rats pendant la période d'observation. Autrement, les animaux traités sont très calmes et présentent une remarquable anorexie et somnolence par rapport au contrôle. Toutefois, après une période de stabilisation, ils recommencent leur vie habituelle. Dans l'étude subaiguë fait par **Rezzagui et al. (2020)**, l'administration orale quotidienne de l'extrait aqueux pendant 28 jours consécutifs n'a entraîné aussi aucune mortalité.

➤ Evolution pondérale

L'évolution pondérale des animaux traités et le contrôle est suivis durant 90 jours de traitement et notée tous les 7 jours à la même heure. Les résultats illustrés dans la **figure 13** montrent qu'au cours du premier mois, une perte de poids a été notée dans tous les groupes traités. Une diminution significative du poids corporel a été observée au cours du deuxième mois. Cependant, une amélioration du poids corporel a été notée au cours du troisième mois dans tous les groupes. Ce résultat a indiqué que l'administration prolongée d'extrait n'a pas perturbé la croissance normale des rats.

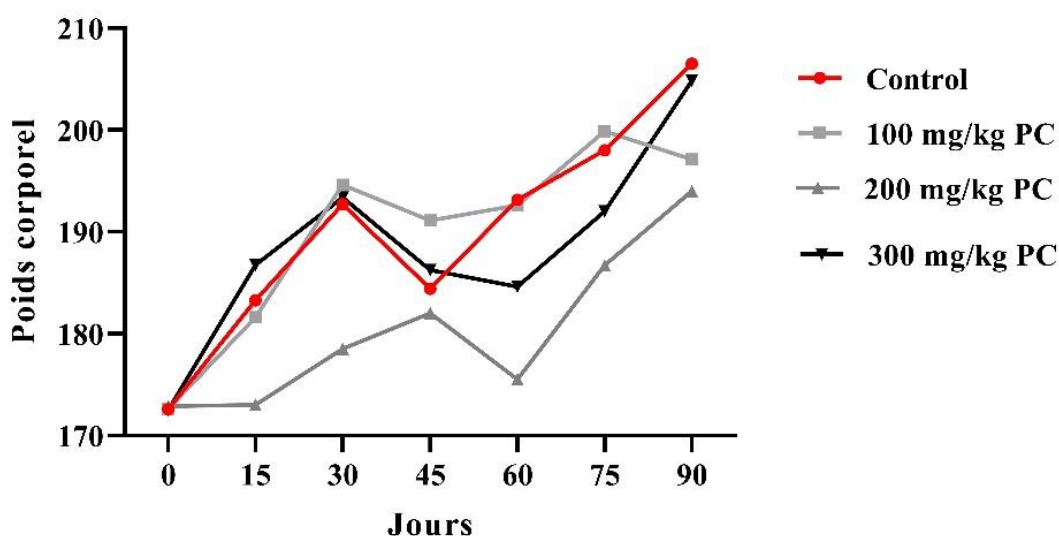


Figure 13. L'effet de l'administration orale chronique d'extrait de *P. harmala* L. sur le poids corporel des rats.

➤ Poids relatifs des organes

L'administration répétée de l'EHm (100, 200 et 300 mg/kg PC) n'a entraîné aucune modification significative du poids des organes (foie, reins, rate, cœur, et poumon) dans les groupes traités par rapport au groupe contrôle. A l'exception d'une faible augmentation de la masse relative de l'estomac pour le groupe traité avec 200 mg/kg a été observée. Les résultats obtenus n'ont indiqué aucun effet toxique dans les groupes traités par rapport au contrôle (**tableau 4**). **Abbas et al. (2021)**, ne révèlent aussi aucun changement notable dans le poids corporel et le poids relatif des organes des animaux traités avec 500 et 1000 mg/kg par rapport au groupe contrôle.

Tableau 4 : Poids relatif des organes des rats contrôle et des rats traités.

	Contrôle	100 mg/kg	200 mg/kg	300 mg/kg
Foie	7.74 ± 0.61	8.11 ± 1.13 ^a	8.34 ± 1.040 ^a	6.72 ± 0.39 ^a
Cœur	0.60 ± 0.05	0.68 ± 0.08 ^a	0.69 ± 0.080 ^a	0.67 ± 0.08 ^a
Reins	0.65 ± 0.03	0.65 ± 0.07 ^a	0.56 ± 0.04 ^a	0.58 ± 0.03 ^a
Rate	0.65 ± 0.03	0.60 ± 0.04 ^a	0.56 ± 0.04 ^a	0.60 ± 0.04 ^a
Estomac	0.46 ± 0.03	0.49 ± 0.07 ^a	0.54 ± 0.08 ^b	0.46 ± 0.07 ^a
Poumon	2.53 ± 0.80	3.37 ± 0.52 ^a	7.72 ± 3.34 ^a	4.87 ± 1.25 ^a

Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=8). (a) : non significatif ($p > 0.05$) ; (b) : $p < 0.01$ par rapport au contrôle.

➤ Paramètres hématologiques et biochimiques

Le système hématopoïétique est l'un des cibles les plus sensibles aux composés toxiques et un indice important de l'état physiologique et pathologique de l'être humain (Pierre *et al.*, 2017). Les modifications du système hématopoïétique ont une plus grande valeur prédictive de la toxicité humaine.

L'effet de l'administration chronique de l'Ehm de *P. harmala* sur les paramètres hématologiques est présenté dans le **tableau 5**. Une augmentation du nombre de plaquettes a été observée dans les groupes traités par rapport au contrôle ($p < 0.01$). Ce qui peut entraîner un risque de thrombose ou de caillot par formation d'agrégats plaquettaires provoquant une obstruction vasculaire, veineuse ou artérielle.

Tous les autres paramètres (hématocrite, hémoglobine, GB et GR) sont restés dans les limites normales pendant toute la durée du traitement. Abbas *et al.* (2021), ont trouvé une légère augmentation des paramètres, y compris les GB, les GR, l'hémoglobine et les PLT par rapport au contrôle lorsque l'extrait de méthanol de *P. harmala* a été administré de 500 et 1000 mg/kg.

Rezzagui *et al.* (2020), ont trouvé que les paramètres hématologiques ont montré des différences dans le nombre de GB et de l'hémoglobine.

Tableau 5 : Effet de l'EHm de *P. harmala* (100, 200 et 300 mg/kg PC) sur les paramètres hématologiques chez des rats *Wistar* femelles traités pendant 90 jours.

	Jours	Control	100 mg/kg	200 mg/kg	300 mg/kg
GB (10⁹ L)	30	9.40 ± 0.50	9.20 ± 1.15 ^a	11.30 ± 1.2 ^a	9.30 ± 4.20 ^a
	60	7.52 ± 1.17	7.8 ± 5.29 ^a	9.28 ± 2.8 ^a	7.7 ± 5.01 ^a
	90	5.56 ± 0.68	5.89 ± 0.71 ^a	7.24 ± 0.85 ^a	5.44 ± 0.46 ^a
Plaquettes (10⁹ L)	30	220.2 ± 115	690 ± 120 ^b	940.3 ± 70 ^b	800 ± 172 ^b
	60	308.7 ± 218	783 ± 274 ^b	811 ± 162 ^b	746 ± 524 ^b
	90	375.6 ± 163	731 ± 58.2 ^b	739 ± 69.5 ^b	699 ± 35.92 ^b
GR (10¹² L)	30	4.94 ± 0.05	5.11 ± 1.03 ^a	6.88 ± 0.04 ^a	4.01 ± 1.36 ^a
	60	5.59 ± 1.25	6.452 ± 1.7 ^a	7.08 ± 0.22 ^a	6.05 ± 2.91 ^a
	90	8.29 ± 0.09	7.77 ± 0.31 ^a	8.68 ± 0.05 ^a	9.97 ± 0.46 ^a
Hématocrite (%)	30	29.4 ± 1.5	21.8 ± 1.3 ^a	40.3 ± 0.6 ^a	24.9 ± 1.30 ^a
	60	35.2 ± 7.05	39.4 ± 10.4 ^a	43.9 ± 0.7 ^a	36.3 ± 17.5 ^a
	90	43.6 ± 0.96	44.3 ± 2.4 ^a	46.7 ± 0.64 ^a	53.6 ± 0.6 ^a
Hémoglobine (g/dl)	30	13.3 ± 0.13	13.4 ± 0.1 ^a	18.0 ± 0.05 ^a	11.9 ± 2.3 ^a
	60	14.2 ± 2.52	15.6 ± 3.9 ^a	17.2 ± 0.4 ^a	13.9 ± 6.9 ^a
	90	14.5 ± 0.21	14.46 ± 0.8 ^a	14.9 ± 0.10 ^a	24.60 ± 7.8 ^a

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n =8/groupe). (a) : non significatif ($p > 0.05$) ; (b) : $p < 0.01$ significatif par rapport au contrôle.

Les différents paramètres biochimiques ont été dosés chez les rats traités à la fin de chaque mois d'expérimentation et sont comparés au contrôle. Les paramètres biochimiques des rats traités et contrôle sont présentés sur la **figure 14**. L'administration orale chronique de l'EHm, pendant 90 jours a provoqué une diminution cruciale de taux d'urée chez les rats traités ($p < 0.01$) par rapport au contrôle jusqu'au dernier jour de traitement. La créatinine représente le marqueur biologique majeur de l'altération rénal (**Jodynis-Liebert et al., 2010**). Une diminution de taux de créatinine a également été observée dans les groupes traités par rapport au contrôle au cours du 1^{ère} mois de l'étude ($p < 0.001$) et aucun changement n'a été observé au 2^{ème} et 3^{ème} mois de l'étude. Le changement dans les niveaux de l'urée et de la créatinine plasmatique indique une altération de la capacité des reins à filtrer les déchets du sang et à les excréter dans l'urine.

Des travaux publiés par **Guergour et al. (2017)** et **Rezzagui et al. (2020)**, ont montré que le traitement des souris femelles avec les alcaloïdes des graines de *P. harmala* n'a pas provoqué des changements significatifs dans les niveaux d'urée, de créatinine et de PAL.

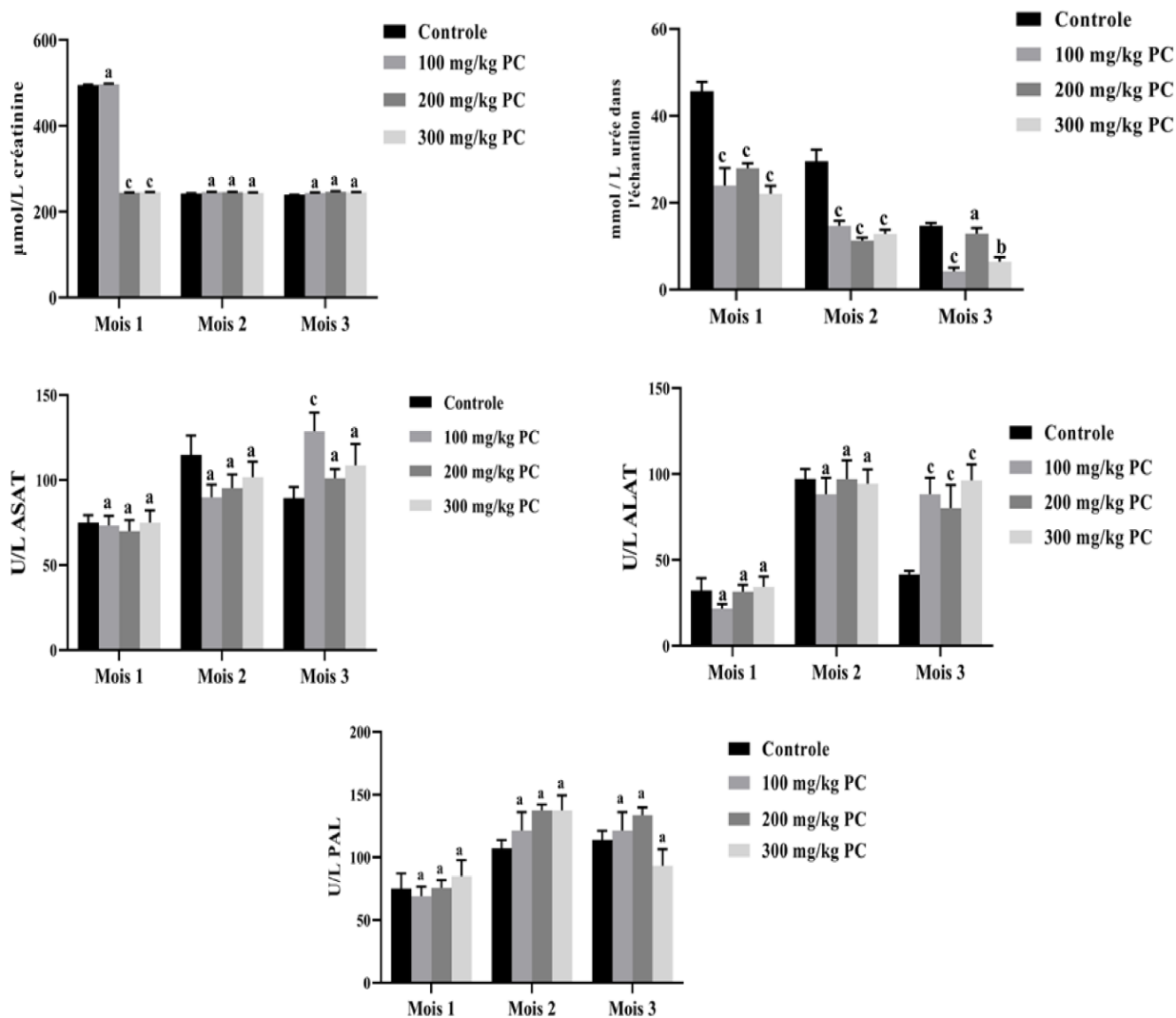


Figure 14. Paramètres biochimiques des groupes contrôle et traités avec l'EHm de *P. harmala*. Les valeurs ont été exprimées en moyenne ± SEM (n= 8). (a) : non significatif, (b) : $p < 0.01$, (c) : $p < 0.001$ significatif par rapport au contrôle. ALAT : alanine aminotransférase, ASAT : aspartate aminotransférase, PAL : phosphatas alcalines.

Le profil hépatique des rats a été évalué sur la base de la valeur de trois enzymes hépatiques (PAL, ASAT et ALAT). En général, l'ASAT et l'ALAT sont des enzymes d'origine mitochondriale et cytoplasmique. Ainsi, toute nécrose cellulaire, destruction du parenchyme hépatique ou une augmentation de la perméabilité membranaire des hépatocytes peut mener à l'écoulement de ces enzymes dans la circulation sanguine et donc à l'augmentation de leurs taux sériques (Jodynis-Liebert *et al.*, 2010).

D'autre part, le PAL est une enzyme ubiquitaire, en particulier dans le foie, les voies biliaires et les reins, où elle est très concentrée. Pas de différences significatives ($p > 0.05$) entre les niveaux de PAL et d'ASAT chez les groupes traités et le contrôle.

L'activité ALAT n'a pas été affectée au cours du 1^{er} et du 2^{ème} mois d'étude, néanmoins, une augmentation de son activité a été notée par rapport au contrôle au 3^{ème} mois. **Lamchouri et al. (2002)**, n'ont pas obtenu les mêmes résultats, le traitement chronique par l'extrait des alcaloïdes augmente significativement le taux de ces enzymes chez les rats traités. Ceci peut être attribué à la différence de la dose administrée (285.5 mg/kg) ainsi que la durée de traitement (4 semaines).

➤ **Histopathologie du foie et des reins**

L'évaluation histopathologique du foie et des reins n'ont présenté aucun changement histologique pertinent chez les rats traité par l'Ehm de *P. harmala* (100, 200 et 300 mg/kg PC). L'observation des coupes histologiques des reins et du foie des rats traités a révélé une protection de l'architecture hépatique et rénale avec une absence des lésions (glomérules adéquats et tubules normaux) par rapport au contrôle. Cependant, une congestion vasculaire minime sur l'histologie du foie autour des vaisseaux sanguine de certains rats traités (100, 200 et 300 mg/kg PC) et une infiltration des cellules inflammatoires entre les tubes rénaux ont été observés chez les animaux traités avec 100 mg/kg PC (**figure 15**).

Une congestion sanguine minimale a également été observée sur l'histologie rénale à 100, 200 et 300 mg/kg et une dilatation sinusoidale pour la dose la plus élevée (300 mg/kg PC) (**figure 16**). La présence de congestions vasculaires sur les sections hépatiques et rénales pourrait être due à l'action de vasodilatation de l'Ehm sur les parois des vaisseaux sanguins (**Ashley, 2004**).

L'étude de **Rezzagui et al. (2020)**, a montré que des changements histologiques ont été observés dans les tissus hépatiques et néphrétiques. **Abbas et al. (2021)**, ont trouvée après l'observation microscopique des reins qu'un œdème interstitiel et des dégénérescences vacuolaires ont été observés dans des expériences de toxicité subaiguë.

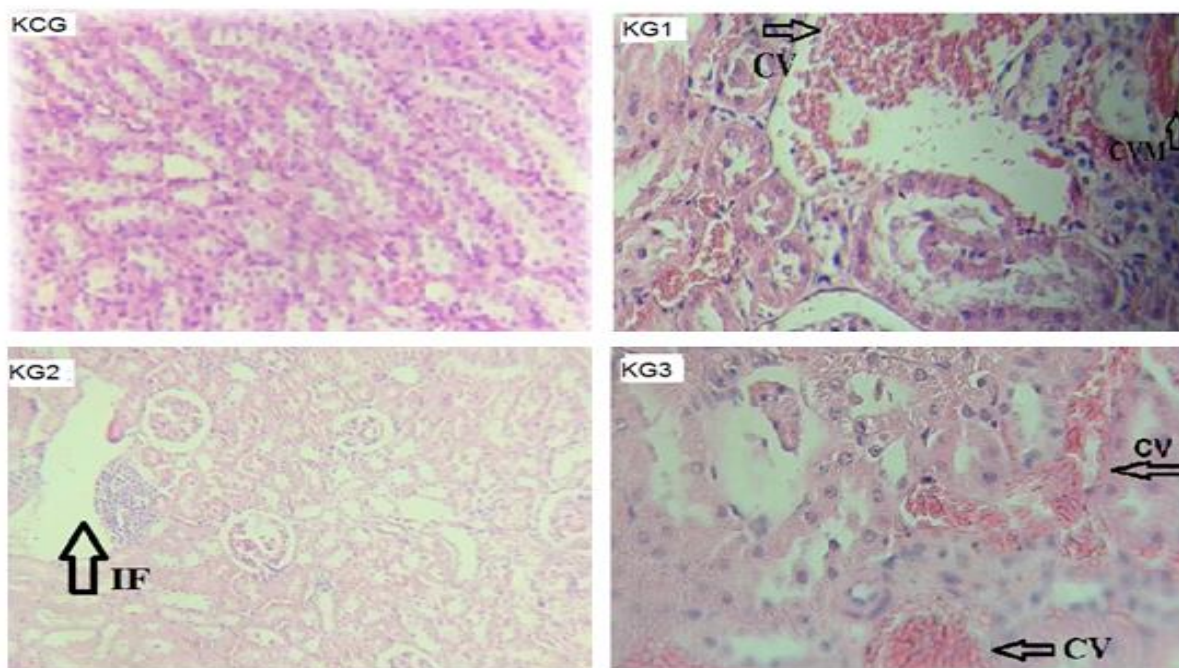


Figure 15. Coupes histologiques rénales des animaux traités et du groupe contrôle (x 40). CV : Congestion vasculaire, If : infiltrat inflammatoire. KCG : rein de groupe contrôle ; KG1 : rein de groupe traités avec 100 mg/kg ; KG2 : rein de groupe traités avec 200 mg/kg ; KG3 : rein de groupe traités avec 300 mg/kg.

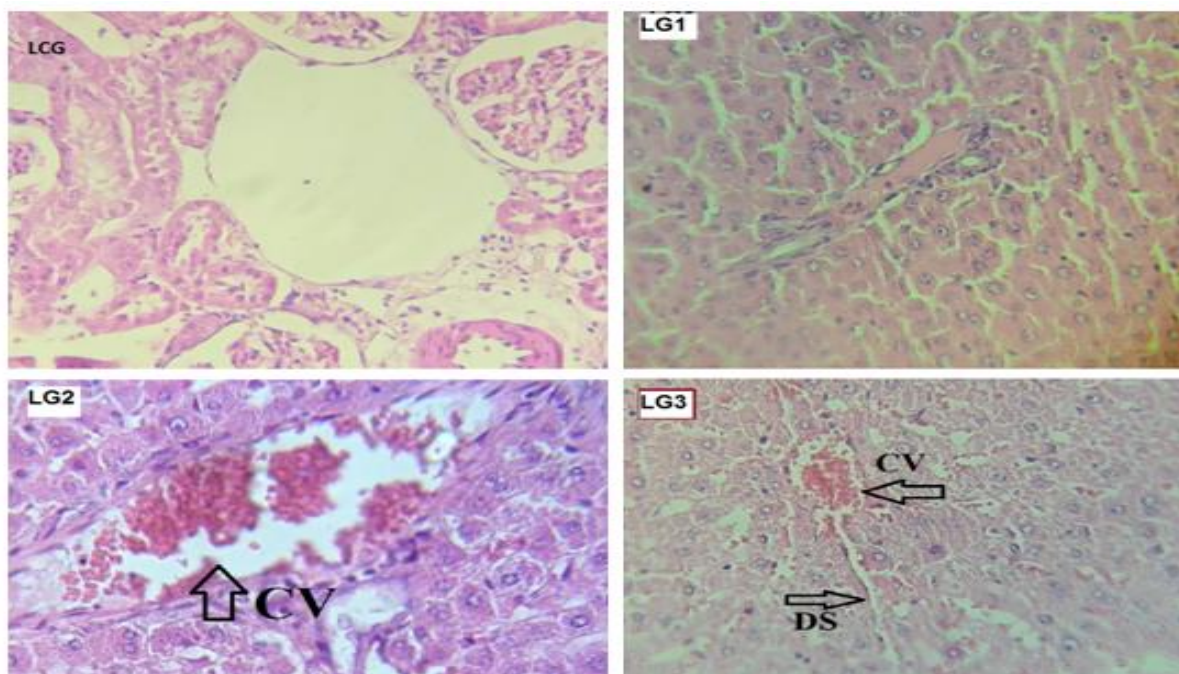


Figure 16. Coupe histologique hépatique des animaux traités et groupe contrôle (x 40). CV : Congestion Vasculaire, DS : dilatation sinusoïdale. LCG : Foie de groupe contrôle ; LG1 : Foie d'animaux traités avec 100 mg/kg ; LG2 : Foie d'animaux traités avec 200 mg/kg ; LG3 : Foie d'animaux traités avec 300 mg/kg.

3.3. Activité antioxydante *in vitro*

La diversité de la nature et la structure des composés végétaux nécessitent le développement de nombreuses méthodes pour évaluer leur activité antioxydante. À cette fin, plusieurs procédures de test *in vitro* sont effectuées pour évaluer l'activité antioxydante.

3.3.1. Activité antiradicalaire

a. Piégeage du radical DPPH

Dans la présente étude, la capacité des extraits de *P. harmala* à piéger les radicaux DPPH a été déterminée par la diminution de son absorbance à 517 nm. Les résultats ont montré que les extraits de *P. harmala* étaient capables de décolorer le radical DPPH violet en DPPH-H jaune et semble dépendre de la concentration. Ces extraits montrent une activité importante de piégeage du radical DPPH : 15.09 à 98.17 % pour l'EHm, 24.30 à 98.93 % pour l'EHe, 11.57 à 83.41 % pour l'EDc et 33.02 % à 91.03 % pour l'EAq.

Des recherches indiquent que l'extrait méthanolique des graines de *P. harmala* présente une capacité plus élevée de piégeage des radicaux libre dans le test DPPH (72 %) en raison de sa richesse en phénols (Iqbal *et al.*, 2019); ces résultats sont en accord avec les résultats de la présente étude. En revanche, les résultats de l'activité anti-radicalaire de l'extrait éthanolique des graines de *P. harmala* obtenus par Allaq *et al.* (2021), inférieur à ceux trouvés dans la présente étude (59.16 ± 0.14 % à 250 $\mu\text{g/ml}$ et de 19.90 ± 1.33 % à 15.6 $\mu\text{g/ml}$).

L'activité antiradicalaire est estimée par la valeur d'IC₅₀ qui représente la concentration d'antioxydant nécessaire pour inhiber 50 % du radical DPPH, plus la valeur IC₅₀ est faible, plus l'activité antioxydante est importante (Oliveira *et al.*, 2016). L'EHm et l'EHe représentent les extraits les plus actifs, leurs IC₅₀ successives sont de 52.41 ± 2.03 $\mu\text{g/ml}$ et 61.16 ± 0.82 $\mu\text{g/ml}$, suivi de l'EAq puis l'EDc avec une IC₅₀ d'ordre de 178.28 ± 1.38 $\mu\text{g/ml}$ et 108.23 ± 0.74 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. Tous les extraits ont montré une activité de piégeage du DPPH inférieure à celles du BHT (IC₅₀ : 28.22 ± 0.17 $\mu\text{g/ml}$) (figure 17).

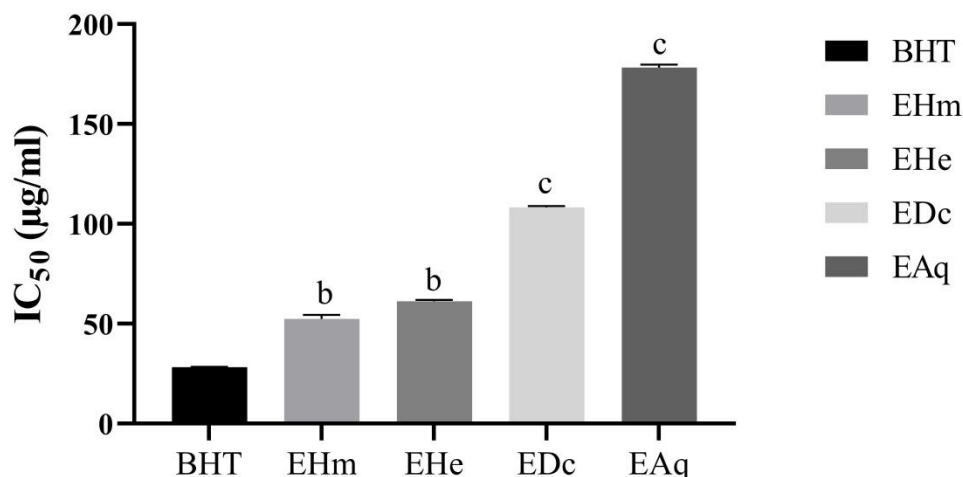


Figure 17. Les concentrations des extraits de *P. harmala* et BHT qui inhibent 50 % du radical DPPH. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n = 3$). (b) ($p < 0.01$) et (c) ($p < 0.001$) Différence significative par rapport au BHT. EHm : extrait hydrométhanolique, EHe : extrait hydroéthanolique, EAq : extrait aqueux, EDc : extrait de décoction.

La comparaison de nos résultats avec d'autres travaux montre que l'EHe des graines de *P. harmala* Algérienne a un effet de piégeage plus important que l'EHe provenant de *P. harmala* Libyenne ($IC_{50} : 170 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$) (Allaq *et al.*, 2021) et de *P. harmala* Irakienne ($IC_{50} : 190 \pm 0.06 \mu\text{g/ml}$) (Kaskoos, 2014). L'effet piégeur de l'extrait méthanolique obtenu dans la présente étude est similaire à ceux trouvées par Elansary *et al.* (2020) ($210 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$) et par Abbas *et al.* (2021) (0.049 mg/ml).

Plusieurs études montrent que l'activité antiradicalaire est corrélée avec la teneur des polyphénols et des flavonoïdes dans les extraits des plantes médicinales (Locatelli *et al.*, 2010). Les différences dans les valeurs IC_{50} peuvent être dues à la nature du solvant, la méthode d'extraction et à l'origine géographique de la plante (Allaq *et al.*, 2021).

b. Piégeage de radical ABTS

Le pourcentage d'inhibition du radical ABTS par les extraits à une concentration de 1 mg/ml était de $90.53 \pm 0.00 \%$, $86.45 \pm 1.04 \%$, $77.08 \pm 0.18 \%$ et $76.13 \pm 0.37 \%$ pour l'EHe, l'EHm, l'EDc et l'EAq, respectivement. Le Trolox est utilisée comme contrôle positif à une activité antioxydante de $88.97 \pm 0.00 \%$ à la concentration de $500 \mu\text{M/ml}$. Les extraits hydroéthanolique et hydrométhanolique avaient l'activité la plus élevée parmi les autres extraits.

Les extraits de *P. harmala* présentent des potentiels importants pour neutraliser le radical ABTS exprimé en $\mu\text{mol.g}^{-1}$ équivalent Trolox (CAET) ; $2.11 \pm 0.001 \mu\text{mol g}^{-1}$ CAET pour l'EHe, $1.48 \pm 0.01 \mu\text{mol g}^{-1}$ CAET pour l'EHm, $1.26 \pm 0.01 \mu\text{mol g}^{-1}$ CAET pour l'EAq et $1.37 \pm 0.01 \mu\text{mol g}^{-1}$ CAET pour l'EDc. De même, pour le test de DPPH, le test d'ABTS a révélé que l'EHm exerçait une activité antioxydante significativement élevée ($p < 0.01$) par rapport aux autres extraits. **Senhaji et al. (2022)** ont trouvé que l'extrait alcoolique de *P. harmala* montra la meilleure activité de piégeage de radical DPPH ($\text{IC}_{50} = 146.20 \pm 13.41 \mu\text{g/ml}$) et ABTS ($49.84 \pm 1.15 \mu\text{g Eq Trolox/mg Ext}$).

3.3.2. Pouvoir réducteur

L'augmentation de l'absorbance à 700 nm indique une augmentation de la capacité réductrice. Les extraits de *P. harmala* ont montré un pouvoir réducteur dose-dépendant (**figure 18**), indiquant qu'ils peuvent agir comme donneurs d'électrons et réagir avec les radicaux libres pour les convertir en produits plus stables.

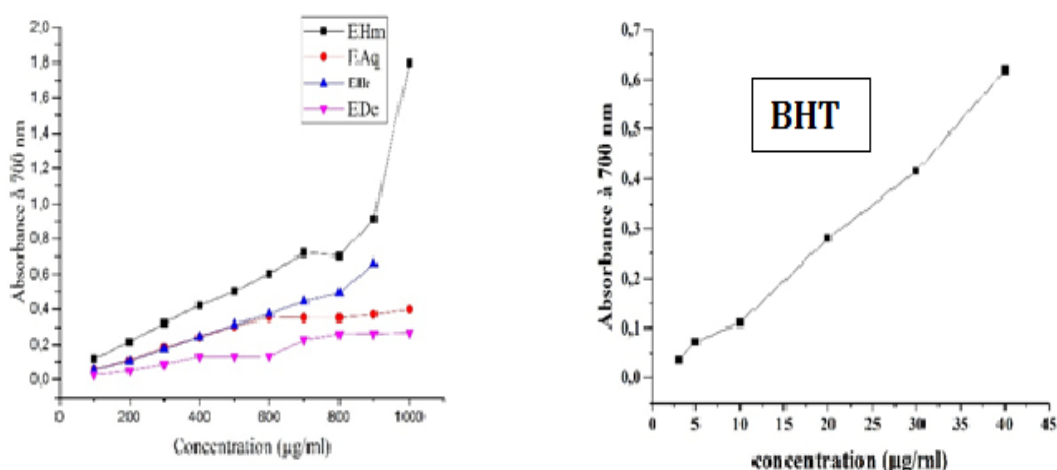


Figure 18. Pouvoir réducteur des extraits de *P. harmala* et de BHT. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=3$). EHm : extrait hydrométhanolique, EHe : extrait hydroéthanolique, EAq : extrait aqueux, EDc : extrait de décoction.

Les résultats représentés par la concentration effectrice à 50 % (EC_{50}), ont montré que l'EHm présente la capacité réductrice la plus élevée avec EC_{50} de $490.33 \pm 1.93 \mu\text{g/ml}$, suivie de l'EHe, l'EAq et de l'EDc avec EC_{50} de $828.23 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$, $848.83 \pm 0.32 \mu\text{g/ml}$ et $969.33 \pm 0.80 \mu\text{g/ml}$, respectivement. Le BHT utilisé comme antioxydant standard avait une EC_{50} de $34.01 \pm 1.33 \mu\text{g/ml}$. Le pouvoir réducteur de tous les extraits était inférieur à celui de BHT ($p < 0.001$) (**figure 19**).

La comparaison de nos résultats avec les résultats obtenue par **Senhaji et al. (2022)** ont montré que l'extrait méthanolique de *P. harmala* ayant le pouvoir réducteur le plus élevé ($34.01 \pm 1.33 \mu\text{g EAA/mg Ext}$). Par ailleurs, les composés phénoliques et les flavonoïdes en particulier sont connus pour leurs propriétés réductrices /antioxydantes (**Katz et al., 2020**).

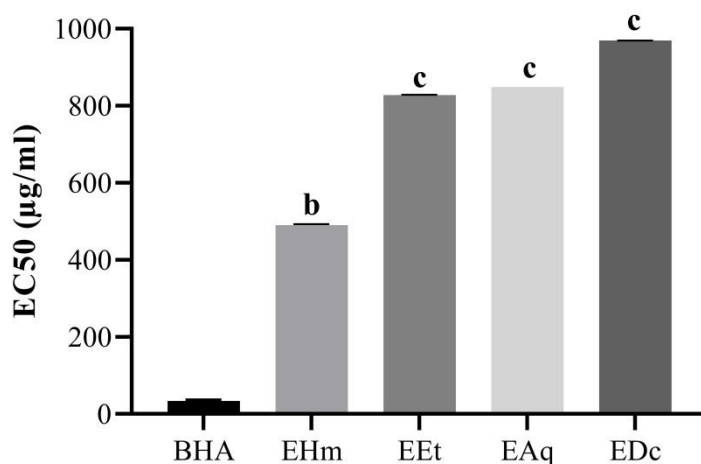


Figure 19. EC₅₀ des extraits de *P. harmala* et de BHA. Les valeurs sont représentées par la moyenne \pm SD (n=3). (b) ($p < 0.01$) et (c) ($p < 0.01$) Différence significative par rapport au BHA. EHm : extrait hydrométhanolique, EHe : extrait hydroéthanolique, EAq : extrait aqueux, EDc : extrait de décoction.

3.3.3. Test au β -carotène

La méthode de blanchissement de β -carotène est largement utilisée pour mesurer l'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits des plantes (**Fidelis et al., 2019**). Les radicaux peroxydes, provenant de l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir des groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique, attaquent le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi son oxydation et donc la disparation de leur couleur orange (**Amarowicz et al., 2010**). Cependant, la présence des antioxydants dans le mélange réactionnel pourrait inhiber relativement l'oxydation de β -carotène.

La cinétique de blanchiment du β -carotène en présence d'extrait, de contrôle et de standard est illustrée sur la **figure 20**. Après 24 h d'incubation, les résultats ont montré que l'EHm et l'EHe sont des inhibiteurs efficaces de la peroxydation lipidique ($76.18 \pm 0.21 \%$ et $73.98 \pm 0.21 \%$, respectivement) en comparaison avec l'EAq et l'EDc ($38.61 \pm 0.19 \%$ et $43.34 \pm 0.89 \%$, respectivement). Pas de différences significatives entre l'EHm, l'EHe et le BHT ($89.11 \pm 0.74 \%$).

Ces résultats pourraient s'expliquer par la capacité de l'EHe et l'Ehm à inhiber la peroxydation de l'acide linoléique suite à son effet scavenger des radicaux libres ou par sa capacité à décomposer les radicaux hydroperoxydes formés durant l'oxydation de l'acide linoléique (Elansary *et al.*, 2020). Cette capacité peut être attribuée à leur teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes (Majid, 2018).

L'activité antioxydante des composés phénoliques est principalement due à leurs propriétés redox, qui peuvent jouer un rôle important dans l'absorption et la neutralisation des radicaux libres par leur capacité de donner de l'hydrogène (Marzouk, 2021).

Le pouvoir antioxydant n'est pas uniquement lié à la teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes mais aussi à leurs natures liposoluble ou hydrosoluble. En effet, Frankel et Meyer (2000) ont trouvé une corrélation entre le caractère lipophile de plusieurs composés phénoliques et l'aptitude à inhiber la peroxydation des lipides. Ils ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes que les antioxydants polaires. Dans ce système, les antioxydants apolaires sont concentrés dans l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation des radicaux lipidiques et, par conséquent, l'oxydation de β -carotène. Cependant, les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont, donc, moins efficaces (Djeridane *et al.*, 2010). Cette proposition explique bien nos résultats dont les extraits moyennement polaires (EHm et EHe) exercent une activité inhibitrice supérieure à celle des extraits polaires (EAq et EDC). Ceci est en accord avec les conclusions de Baghiani *et al.* (2012) et de Elansary *et al.* (2020).

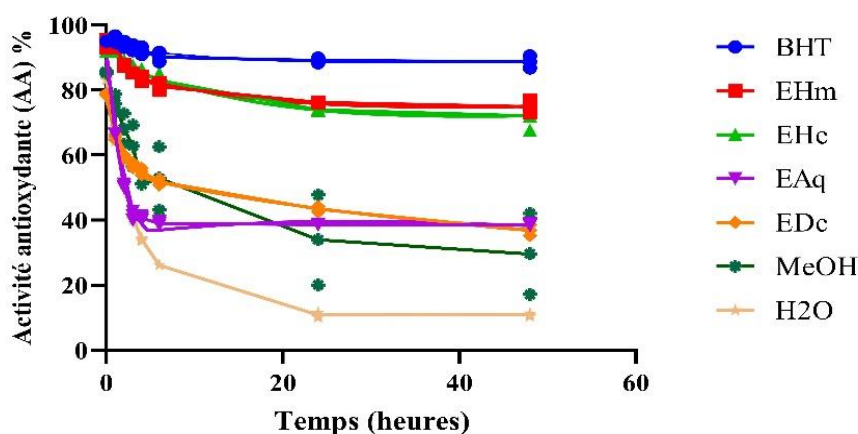


Figure 20. Cinétique de blanchiment au β -carotène en présence des extraits de *P. harmala*, eau, méthanol et BHT pendant 48 h. Ehm : extrait hydrométhanolique, EAq : extrait aqueux, EHe : extrait hydroéthanolique, EDC : extrait de décoction, BHT : hydroxytoluène butylé, MeOH : méthanol.

3.3.4. Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale de divers extraits de *P. harmala* a été estimée à l'aide d'un dosage au phosphomolybdate. L'activité antioxydante totale est déterminée à partir de l'équation de régression linéaire ($y = ax + b$) de la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide ascorbique. Nos résultats indiquent que l'Ehm et l'EHe possèdent des fortes capacités antioxydante ($169.11 \pm 0.13 \mu\text{g EAA/mg ES}$ et $123.01 \pm 0.96 \mu\text{g EAA/mg ES}$, respectivement) par rapport à l'EAq et l'EDc ($65.47 \pm 2.19 \mu\text{g EAA/mg ES}$ et $37.31 \pm 1.05 \mu\text{g EAA/mg ES}$, respectivement), mais cette capacité reste faible et significativement inférieur ($p < 0.001$) à celle de BHT, dont la capacité antioxydante est de $205.38 \pm 0.93 \mu\text{g EAA/mg}$ (figure 21).

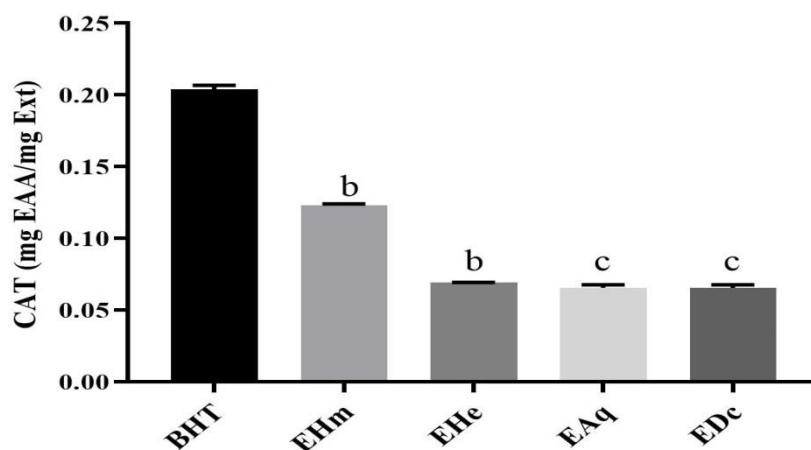


Figure 21. La capacité antioxydante totale des extraits de *P. harmala* et le BHT. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD ($n=3$). (b) ($p < 0.01$) et (c) ($p < 0.001$) Différence significative par rapport au BHT. Ehm : extrait hydrométhanolique, EHe : extrait hydroéthanolique, EAq : extrait aqueux, EDc : extrait de décoction.

3.3.5. Pouvoir de chélation de fer

L'effet chélateur exprimé par la concentration effectrice EC_{50} . La présente étude montre que tous les extraits étudiés possèdent une activité chélatrice en capturant les ions ferreux avant qu'ils soient complexés avec la ferrozine, selon le principe de la technique. D'après les valeurs d' EC_{50} obtenues, la puissance de la capacité de chélation du fer ferreux du l'Ehm ($184.3 \pm 31.0 \mu\text{g/ml}$) est statistiquement inférieure à celle des extraits : EHe ($1275.8 \pm 69.0 \mu\text{g/ml}$), EDc ($736.8 \pm 58.0 \mu\text{g/ml}$) et EAq ($1478.9 \pm 52.0 \mu\text{g/ml}$). Les valeurs d' EC_{50} montrent que l'Ehm présente de puissante activité de chélation, mais reste inférieure à celle de l'EDTA ($230.2 \pm 18.3 \mu\text{g/ml}$) ($p < 0.01$). Ceci est en accord avec les résultats d'Iqbal *et al.* (2019).

Le pouvoir chélatant des extraits est probablement dû à la présence des molécules antioxydantes capables de se complexer avec les ions ferreux. Selon la littérature, les composés phénoliques et les flavonoïdes s'avèrent de bons chélateurs des ions métalliques (Huyut *et al.*, 2017). Sahreen *et al.* (2010) ont montré que les extraits des plantes induisent des effets chélateurs de manière directement liée à la polarité des solvants utilisés. Le pouvoir chélateur de nos extraits est important, et permet d'inhiber la peroxydation. Par conséquent, les extraits de *P. harmala* peuvent être utilisés comme source naturelle d'antioxydants.

3.4. Activité antioxydante *in vivo*

3.4.1. La capacité antioxydante plasmatique (CAP)

La CAP est l'un des paramètres les plus utilisés pour évaluer l'efficacité d'une supplémentation alimentaire ou d'un traitement antioxydant. L'analyse *in vivo* de la capacité antioxydante des groupes traités et de contrôle a été estimée à l'aide de teste de DPPH et le teste de pouvoire réducteur de fer.

a. Capacité antioxydante plasmatique vis-à-vis le radical DPPH

La CAP contre le radical DPPH, a été exprimée en pourcentage. Les résultats obtenus ont montré que la vitamine C (100 mg/kg PC) et l'Ehm de *P. harmala* (300 mg/kg PC) augment la CAP (30.07 ± 0.15 % et 29.01 ± 1.33 %, respectivement) par rapport au groupe contrôle (26.28 ± 0.32 %) (figure 22).

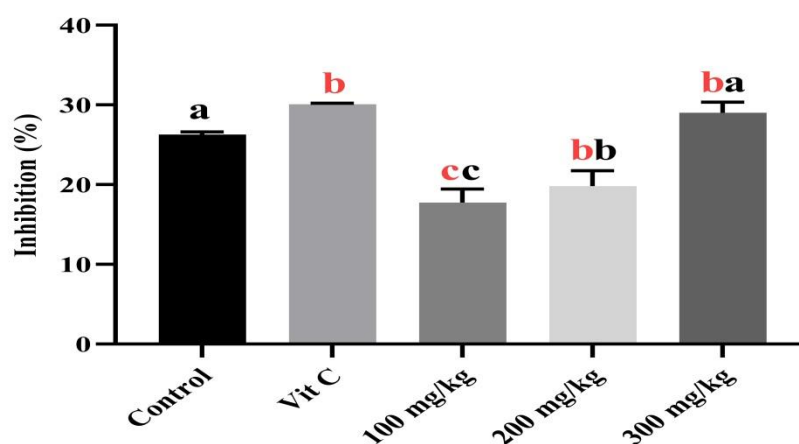


Figure 22. Activité antioxydante plasmatique des rats traités par l'Ehm de *P. harmala*, par la vitamine C et par le DMSO 4 % (contrôle) contre le radicle DPPH. Les valeurs exprimées en moyenne \pm SEM (n= 8). (a) : non significatif, (b) : $p < 0.01$, (c) : $p < 0.001$. Les lettres rouges : différence significative en comparaison avec le contrôle. Les lettres noires : différence significative en comparaison avec la vitamine C.

b. Pouvoir réducteur du plasma

Le CAP s'exprime aussi par le pouvoir du plasma à réduire l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}). Les résultats obtenus (**figure 23**) montrent que le traitement par l'Ehm de *P. harmala* à augmenter le pouvoir réducteur du plasma. L'effet maximal a été atteint à une dose de 300 mg/Kg PC (0.457 nm), et le pouvoir réducteur était supérieur à celui du groupe contrôle (0.347 nm) et similaire à celui de vitamine C (0.446 nm).

Le plasma du contrôle était capable de piéger le radical DPPH et de réduire le fer ferrique en fer ferreux. Cela peut s'expliquer par les antioxydants endogènes présents dans le plasma tels que l'acide urique et le glutathion réduit. Ces antioxydants peuvent agir de manière complémentaire et synergique pour assurer une meilleure protection contre les ERO (Fang *et al.*, 2002).

Par conséquent, l'augmentation de la CAP pourrait logiquement être attribuée à la forte concentration d'antioxydants exogènes tels que les flavonoïdes et les composés phénoliques acquis après le traitement avec les extraits de *P. harmala*. Les résultats observés sont en cohérents avec la suggestion menée par Andallu *et al.* (2011) qui ont suggéré que la CAP résulte de l'action synergique des antioxydants endogènes et diverses molécules phytochimiques des extraits administrés.

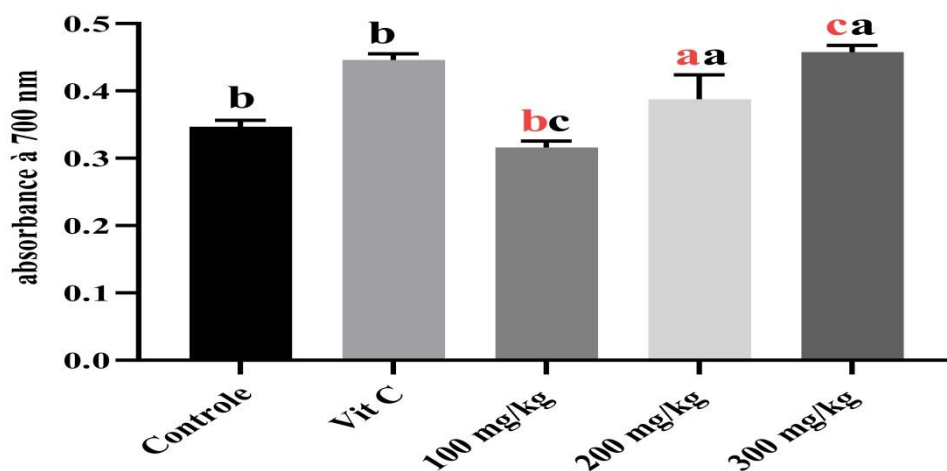


Figure 23. La capacité de réduction ferrique des rats traités par différentes doses de l'Ehm de *P. harmala*, par la vitamine C et par le DMSO 4 % (contrôle). Les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm SEM (n= 8). (a) : non significatif, (b) : $p < 0.01$, (c) : $p < 0.001$. Les lettres rouges : différence significative en comparaison avec le contrôle. Les lettres noires : différence significative en comparaison avec la vitamine C.

3.4.2. Etat redox hépatique

Le foie est un organe très sensible qui joue un rôle majeur dans la maintenance et la performance de l'homéostasie de notre corps. C'est le principal organe où les processus importants comme le métabolisme et la détoxification ont lieu. Ainsi, le foie est l'organe le plus exposé aux dommages en raison de l'exposition chronique aux médicaments, les toxiques environnementaux et autres xénobiotiques (Lewis *et al.*, 2004). Les troubles hépatiques sont l'un des problèmes de santé les plus graves, la raison pour laquelle il a été choisi pour ce travail.

a. L'activité enzymatique de la catalase

La catalase (CAT) est une enzyme indispensable pour la détoxification des ERO pendant les conditions de stress. Elle catalyse la conversion de H₂O₂ en eau et en oxygène (Ighodaro *et al.*, 2018). Selon les résultats obtenus (tableau 6), une augmentation significative ($p < 0.01$) dose dépendante des niveaux de CAT dans le foie a été observée dans les groupes traités par l'Ehm. A la dose 300 mg/kg, le niveau de CAT est presque supérieur à ceux du groupe contrôle, et similaire à celle de la vitamine C. Plusieurs études ont montré que l'administration des extraits riche en polyphénols augmentent significativement l'activité de catalase (Aouchria *et al.*, 2017; Righi *et al.*, 2020).

b. Taux du glutathion (GSH)

Le GSH est l'un des tripeptides les plus abondants, il est largement distribué au niveau des hépatocytes. Ses fonctions sont principalement concernées par la neutralisation de radicaux libres tels que H₂O₂ et radicaux superoxyde (Ogeturk *et al.*, 2005). Le GSH constitue la première ligne de défense contre les ERO (Kivrak *et al.*, 2017). Pour cette raison notre étude sur la capacité antioxydante de l'Ehm s'est étalée à l'étude de l'évaluation des taux de GSH hépatique.

D'après les résultats obtenus (tableau 6), on constate que l'administration de l'Ehm (300 mg/kg) a provoqué une augmentation significative ($p < 0.01$) du taux de GSH par rapport au groupe contrôle. Cette augmentation est presque similaire à celle de la vitamine C. Nos résultats corroborent avec ceux de beaucoup des résultats réalisés sur des variétés de plantes (Guemmaz *et al.*, 2018 ; Righi *et al.*, 2020). Il est certain que la supplémentation de l'alimentation ou l'administration orale d'extrait végétaux riches en polyphénols et en flavonoides réservé avec succès le taux de GSH (Goodla *et al.*, 2019).

c. Taux de MDA

La peroxydation lipidique est une altération oxydative des acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires qui provoque une destruction et des dommages entraînant des modifications de la perméabilité et de la fluidité des membranes et génère un certain nombre de produits de dégradation, entraînant un stress oxydatif (Forman *et al.*, 2015). Par conséquent, la mesure de la peroxydation lipidique est un indicateur important dans l'évaluation du potentiel antioxydant. Le MDA, qui est un produit final de la peroxydation lipidique, et également l'un des biomarqueurs les plus fréquemment utilisés pour évaluer l'activité antioxydante *in vivo* (Reddy *et al.*, 2017).

Les résultats présentés dans le **tableau 6** montrent que l'administration de l'EHm (200 et 300 mg/kg) aux rats a provoqué une diminution significative dose dépendante ($p < 0.001$) du taux du MDA par rapport au contrôle. Une réduction de presque 50 % des niveaux de MDA a été observée à une dose de 300 mg/Kg par rapport au contrôle et au groupe de la vitamine C. Ces résultats suggèrent que l'EHm de *P. harmala* est capable d'empêcher ou de diminuer la peroxydation des lipides hépatiques (Pradeep *et al.*, 2007), cette capacité peut être attribuée à sa richesse en polyphénols à savoir les acides phénoliques et les flavonoïdes dont les flavones et les flavonols. Ces composés sont connus pour leur activité scavenger des ERO, agissant ainsi comme antioxydants et interrompant la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique (Moyo *et al.*, 2012). Il est important de noter qu'il existe une ressemblance entre les résultats de blanchissement de β -carotène (déterminé *in vitro*) et le taux de MDA (déterminé *in vivo*).

Tableau 6. L'activité de Catalase (μ mole/min/mg de protéine), taux de GSH (nmole/g de tissu) et taux de MDA (nmole/g de tissu) dans le foie des rats.

Groupes	Control	100 mg Vit C /kg PC	100 mg Ext/kg PC	200 mg Ext/kg PC	300 mg Ext/kg PC
CAT	9.07 \pm 0.97 [#]	10.05 \pm 0.57 [*]	5.35 \pm 0.79 ^{*/a}	8.98 \pm 1.60 ^{a/#}	11.80 \pm 1.24 ^{*/a}
GSH	25.25 \pm 0.98 [#]	39.45 \pm 4.18 [*]	12.07 \pm 0.96 ^{*/#}	16.70 \pm 0.91 ^{*/#}	35.18 \pm 4.90 ^{*/a}
MDA	27.95 \pm 0.81 [#]	22.55 \pm 0.45 [*]	22.03 \pm 0.81 ^{*/a}	15.65 \pm 1.17 ^{*/#}	15.51 \pm 0.28 ^{*/#}

Les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm SEM (n= 8). (a) : non significatif, (*) : Différence significative en comparaison avec le contrôle. (#) : Différence significative en comparaison avec la vitamine C.

3.5. Effet antiprolifératif

La chimiothérapie joue un rôle important dans la prévention et le traitement du cancer ; mais son efficacité est limitée par la résistance cellulaire aux médicaments, nécessitant donc une amélioration constante des traitements. De nouvelles classes d'agents chimio-thérapeutiques ont été continuellement développées, parmi lesquelles les composés naturels ont de plus en plus attiré l'intérêt pour le développement des nouveaux médicaments (DeVita Jr et Chu, 2008).

La croissance de lignées cellulaires cancéreuses humaines a été évaluée à l'aide du test colorimétrique MTT, est une méthode généralement utilisée pour étudier l'action des composés naturels et les extraits des plantes sur la prolifération cellulaire, la viabilité et la cytotoxicité, comme elles sont décrites par Mosmann (1983).

Dans cette étude, nous avons déterminé l'effet de différentes concentrations des extraits de *P. harmala* sur la survie des cellules *HeLa*. Les résultats obtenus suggèrent que l'Ehm et l'EHe a fortement inhibé la prolifération des cellules *HeLa* avec un pourcentage d'inhibition de 41.18 ± 1.12 % (à 0.015 mg/ml) et de 99.77 ± 0.15 % (à 2 mg/ml) pour l'Ehm et de 36.48 ± 1.96 % (à 0.015 mg/ml) et de 97.99 ± 0.85 % (à 2 mg/ml) pour l'EHe (figure 24), cela montre que les deux extraits sont des puissants inhibiteurs de la croissance des cellules cancéreuses. Alors que la croissance des mêmes cellules exposées à l'EAq et l'EDc n'a pas été significativement réduite. Les valeurs d'IC₅₀ de l'Ehm, l'EHe, l'EDc et l'EAq ont été évaluées à 30.16 ± 0.4 µg/ml, 27.59 ± 0.7 µg/ml, 242.29 ± 0.4 µg/ml et 230.2 ± 0.14 µg/ml, respectivement.

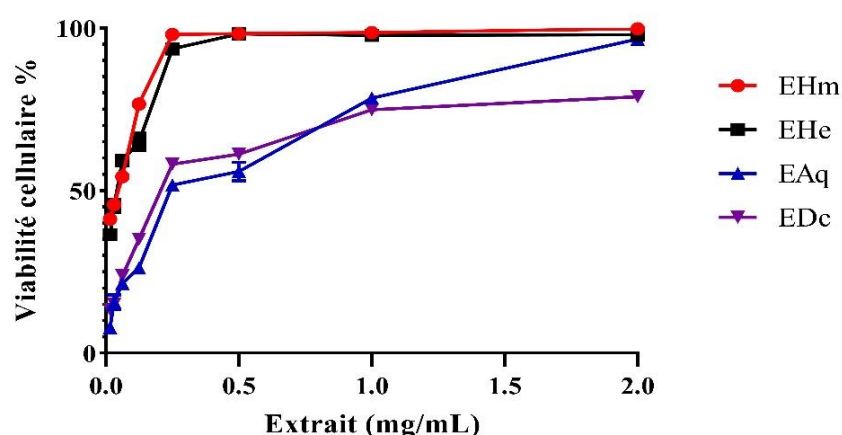


Figure 24. Pourcentage d'inhibition de la viabilité de la lignée cellulaire *HeLa* par les extraits de *P. harmala*. Chaque valeur représente la moyenne \pm SD (n=3). EHm : extrait hydrométhanolique, EHe : extrait hydroéthanolique, EAq : extrait aqueux, EDc : extrait de décoction.

Les critères de cytotoxicité pour un extrait brut, établis par l'Institut National de Cancer (NCI) des États-Unis dans les essais préliminaires, rapportent que les extraits avec un $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$ sont fortement cytotoxiques. Un composé dont l' IC_{50} est compris entre 100-1000 $\mu\text{g/ml}$ est potentiellement nocif et un composé dont l' IC_{50} supérieur à 1000 $\mu\text{g/ml}$ est potentiellement non toxique (**Ellithey et al., 2014**).

L'E_{Hm} et l'E_{He} ont induit une diminution significative de la viabilité cellulaire et ont présenté une $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$ pour les cellules *HeLa* par rapport à l'E_{Aq} et l'E_{Dc}, nous pouvons donc les considérer comme une source active et potentielle de molécules cytotoxiques envers les cellules cancéreuses *HeLa*. Tandis que les extraits aqueux et décoction peuvent être considérés comme faiblement cytotoxiques contre les cellules *HeLa*, les valeurs IC_{50} sont comprises entre 100-1000 $\mu\text{g/ml}$.

Atrooz et al. (2018) ont montré qu'après le traitement avec un extrait méthanolique de *P. harmala*, le processus apoptotique de la lignée cellulaire cancéreuse augmente par rapport au contrôle. Ce produit naturel cytotoxique pourrait jouer un rôle vital dans le traitement de certains cancers en travaillant en synergie avec les médicaments chimiothérapeutiques conventionnels (**Wang et al., 2020**).

P. harmala est couramment décrite en médecine traditionnelle, pour traiter nombreuses maladies, dont le cancer (**Lamchouri et al., 2000**). Des effets cytotoxiques de l'extrait brut de graines de cette plante, tels que les extraits aqueux, hydro-alcooliques et méthanoliques, ont été précédemment rapportés et présentent un potentiel cytotoxique considérable (**Wang et al., 2015 ; Elansary et al., 2020**).

La teneur élevée en alcaloïdes, en flavonoïdes et en triterpénoïdes dans les extraits de *P. harmala* pourrait expliquer au moins en partie l'activité cytotoxique mise en évidence (**Zhang et al., 2022**). En effet, certains flavonoïdes sont cytotoxiques à des concentrations plus élevées vers les cellules humaines normales et ils ont la capacité de bloquer la prolifération des cellules humaines issues de cancers (**Alvarado-Sansininea et al., 2018**). Il a également été rapporté que les extraits alcaloïdes bruts de graines inhibent la viabilité des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 (IC_{50} : 30 mg/ml) (**Shabani et al., 2015**) ; de plus, les alcaloïdes de quinazoline purifiés à partir de graines de *P. harmala* ont inhibé la viabilité de la lignée cellulaire de cancer mammaire (MCF7) (**Bensalem et al., 2014**).

3.6. Effet anti-inflammatoire

3.6.1. Effet anti-inflammatoire *in vitro*

L'inflammation est considérée comme un mécanisme de protection du corps qui aide à la survie en éliminant les agents infectieux et en régulant l'homéostasie des tissus en réponse à des stimuli nocifs (Benly, 2015). La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure secondaire et tertiaire lorsqu'elles sont exposées à un stress externe ou chimique (Murugan et Parimelazhagan, 2014). Des études antérieures valident le lien entre les problèmes inflammatoires et la dénaturation des protéines tissulaires (Williams *et al.*, 2008).

Pour évaluer l'effet anti-inflammatoire *in vitro* de *P. harmala*, la capacité des extraits à inhiber la dénaturation de BSA a été estimée. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits inhibent la dénaturation de la BSA. Cette inhibition est statistiquement similaire à celle de l'anti-inflammatoire de référence (Diclofénac), qui exprime un pourcentage d'inhibition de 85.95 ± 0.56 % à une concentration de 250 $\mu\text{g/ml}$.

Cependant, les pourcentages d'inhibition obtenus avec les extraits de graines de *P. harmala* aux concentrations de 250 $\mu\text{g/ml}$ sont de 80.61 ± 0.84 % ; 78.93 ± 0.28 % ; 76.68 ± 0.84 % et 76.40 ± 1.12 % pour l'EHm, l'EAq, l'EHe et l'EDc, respectivement (figure 25). Nos résultats sont presque identiques à ceux trouvés par Abbas *et al.* (2021) qui ont montré que l'extrait méthanolique (100 %) présente une inhibition de 63.0 % contre la dénaturation de BSA par rapport à une inhibition de 97 % par le Diclofénac à 400 $\mu\text{g/ml}$.

Il est très important de souligner qu'il existe de nombreux rapports qui indiquent l'importance de la dénaturation des protéines en tant que cause d'inflammation (Sharma *et al.*, 2021). La production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo* (De *et al.*, 2016). L'EHm et le Diclofénac empêchent la dénaturation de BSA d'une manière dépendante de la concentration. La stabilisation de l'albumine peut se produire après interaction directe avec l'extrait. Cette interaction pourrait augmenter l'énergie libre de l'état dénaturé de la protéine, favorisant ainsi son état natif, il s'agit d'une stabilisation thermodynamique (Sharma *et al.*, 2012). D'après les résultats dont nous disposons, nous pouvons supposer que notre extrait peut inhiber la formation d'auto-antigènes en inhibant la dénaturation des protéines et donc inhiber la formation d'auto-anticorps observée dans les maladies auto-immunes.

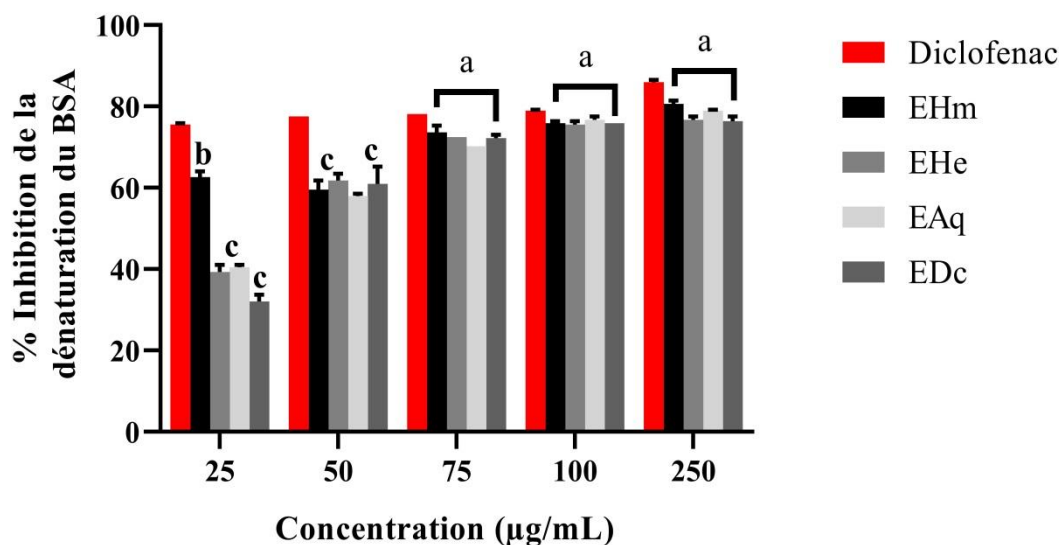


Figure 25. Effet anti-inflammatoire *in vitro* des extraits de *P. harmala* et de Diclofénac. EHm : extrait hydrométhanolique, EAq : extrait aqueux, EHe : extrait hydroéthanolique, EDc : extrait de décoction. Chaque valeur représente la moyenne de trois tests \pm SD (n=3). (a) : non significative, (b) : $p < 0.01$, (c) : $p < 0.001$.

Des études antérieures ont montré que les extraits des plantes qui ont une activité antioxydante présentent également des propriétés notables de stabilisation de la membrane d'une manière dépendante de la concentration (Moussaid *et al.*, 2011 ; Abbas *et al.*, 2021). Khlifi *et al.* (2013) ont étudié *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalpensis* et *P. harmala*, et ont également montré une relation directe entre les composés phénoliques, l'activité antioxydante et le potentiel anti-inflammatoire.

3.6.2. Effet anti-inflammatoire *in vivo*

L'effet anti-inflammatoire *in vivo* des extraits de *P. harmala* a été étudié en utilisant le modèle d'œdème de l'oreille induit par le xylène chez la souris, qui est un modèle d'inflammation aiguë et constitue une bonne valeur prédictive pour le dépistage d'agents anti-inflammatoires (Kanathip *et al.*, 2020).

Les souris du groupe contrôle, qui ont reçu localement 30 µl de xylène sur la surface interne de l'oreille droite, ont développé au bout d'une heure un œdème caractérisé par une augmentation du poids du disque de l'oreille de 12.62 ± 1.19 mg. L'administration de 100 mg/kg de Diclofénac par voie orale 1 heure avant l'induction de l'œdème a provoqué une diminution significative ($p < 0.001$) de l'œdème de l'oreille par rapport à celui des souris du contrôle. Le poids de l'œdème, une heure après l'induction de l'inflammation est de 2.06 ± 0.31 mg, ce qui correspond à une inhibition de 86.75 ± 1.19 % (figure 26).

Le traitement par 200 mg/kg d'extrait de *P. harmala* par voie orale a induit une réduction significative ($p < 0.001$) de l'inflammation par rapport aux souris du contrôle. Une diminution du poids des disques de l'oreille de 2.36 ± 0.18 mg, 4.8 ± 1.28 mg et 3.84 ± 0.69 mg est observée respectivement dans l'Ehm, l'EHe et l'EAq, ce qui correspond à un pourcentage d'inhibition de 84.28 ± 0.55 % ; 76.38 ± 2.94 % et 76.25 ± 3.18 %, respectivement ; cette inhibition est similaire à celle du Diclofénac. Un effet anti-inflammatoire de l'EDc plus faible par rapport à celui du Diclofénac, il présentait un œdème de 8.82 ± 0.90 mm et une inhibition de 29.59 ± 6.60 %.

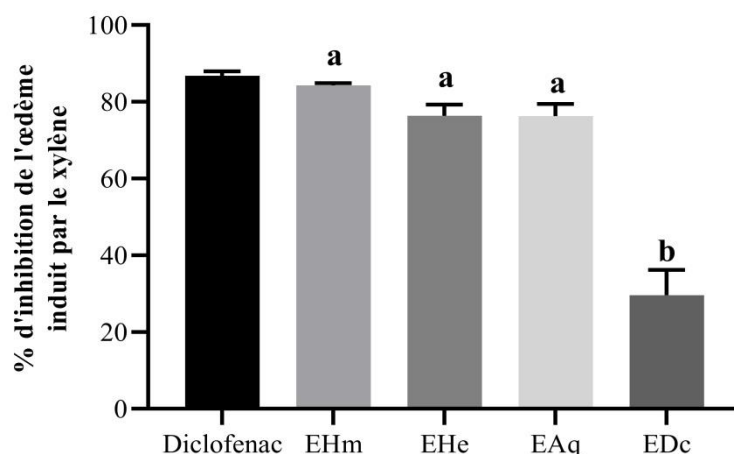


Figure 26. Pourcentage d'inhibition de l'œdème par les extraits de *P. harmala* et le Diclofénac. Ehm : extrait hydrométhanolique, EAq : extrait aqueux, EHe : extrait hydroéthanolique, EDc : extrait de décoction. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=8). (a) : non significative, (b) : $p < 0.01$. La comparaison est faite avec le Diclofénac.

L'application de xylène à l'oreille induit une accumulation de liquide conduisant à la formation d'un œdème, caractéristique d'une inflammation aiguë (Okoli *et al.*, 2007). Le poids de l'œdème atteint son maximum 1 h après l'application du xylène. Le mécanisme moléculaire et cellulaire par lequel le xylène induit l'inflammation implique des neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine, qui, lors de la stimulation, libèrent un certain nombre de médiateurs pouvant initier la réponse inflammatoire (Kanathip *et al.*, 2020), ce phénomène est connu sous le nom d'inflammation neurogène. La substance P et le peptide lié au gène de la calcitonine sont les principaux initiateurs de l'inflammation neurogène. Cette substance est un neurotransmetteur dans le système nerveux central, induit la libération d'oxyde nitrique à l'origine de la vasodilatation et de l'exsudation plasmatique en agissant sur les muscles lisses des vaisseaux sanguins et des cellules endothéliales (Kanathip *et al.*, 2020).

Il est également admis que les neurones sensoriels contiennent des cyclooxygénases capables de synthétiser des prostaglandines pro-inflammatoires (Kanathip *et al.*, 2020). Le prétraitement des souris avec l'EHm entraîne une inhibition significative du développement de l'œdème. Cette inhibition est statistiquement similaire à celle exercée par l'anti-inflammatoire de référence (Diclofénac).

3.7. Effet antiarthritique de l'EHm

3.7.1. Étude préventive

➤ Effet de de l'EHm de *P. harmala* sur le poids corporel

Le suivi régulier des animaux a montré une différence entre le gain du poids des rats arthritiques. Les rats de GCA ont progressivement perdu du poids par rapport aux rats de GCN 14 jour après la première immunisation. En revanche, l'évolution normale de la masse corporelle des rats arthritiques ayant reçus les différentes doses de l'EHm de *P. harmala* témoigne la capacité de cet extrait à maintenir constant le poids des rats (tableau 7).

Tableau 7 : Effet de l'EHm de *P. harmala* sur le poids des rats arthritiques.

Traitement	GCA	GCN	50 mg/kg PC	100 mg/kg PC
1^{ère} immunisation	220.7 ± 0.88 ^a	220.7 ± 7.91 ^a	220.8 ± 3.41 ^a	220.8 ± 6.48 ^a
4^{ème} jour	222.5 ± 5.53 [#]	211.6 ± 3.70 [*]	209.1 ± 3.78 ^{*/a}	219.7 ± 5.84 ^a
2^{ème} immunisation	219.8 ± 5.32 [#]	174.1 ± 6.09 [*]	210.5 ± 4.49 ^{*/#}	217.3 ± 5.51 ^{a/#}
10^{ème} jour	169.7 ± 5.65 [#]	180.8 ± 6.82 ^a	211 ± 4.50 ^{*/#}	222.7 ± 5.32 ^{*/#}
14^{ème} jour	160.1 ± 6.09 ^a	174.3 ± 6.91 ^a	202 ± 4.50 ^{*/#}	202.3 ± 5.07 ^{*/#}
17^{ème} jour	163.7 ± 3.63 ^a	176.8 ± 7.014 ^a	204 ± 5.40 ^{*/#}	204.3 ± 5.78 ^{*/#}
21^{ème} jour	168.7 ± 4.03 [#]	177.5 ± 6.76 ^a	174.2 ± 5.07 ^a	202.1 ± 7.03 ^{*/#}

GCA : groupe contrôle arthritique, GCN : groupe contrôle normal. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=8). (*) : Différence significative en comparaison avec GCA. (#) : Différence significative en comparaison avec GCN. (a) : non-significatif.

Singhai et Patil (2021), ont trouvés aussi que les extraits de *P. harmala* et le médicament standard ont montré une amélioration significative au 21^{ème} jour, dans le mouvement des rats, ce qui indique la guérison des complications arthritiques. Les mêmes résultats sont trouvés par Akhtar *et al.* (2022) qui ont montré que le traitement curatif par l'extrait méthanolique de feuilles de *P. harmala* est efficace contre l'arthrite induite par l'adjuvant complet de Freund.

La perte de poids a été significativement augmentée chez les rats de GCA qui avait des difficultés à se déplacer et ne pouvait pas accéder à la nourriture en raison du gonflement de ses pattes. Cette perte de poids pourrait aussi être associée à une diminution de la prise alimentaire des rats (perte d'appétit) (Singhai et Patil, 2021).

➤ Effet de l'Ehm de *P. harmala* sur la CRP

La CRP est une protéine de la phase aiguë synthétisée dans le foie dans des conditions d'inflammation systémique et est utilisée pour déterminer le taux de progression de l'arthrite (Akhtar *et al.*, 2021). La synthèse de CRP est activée par l'afflux de macrophages et de fibroblastes synoviaux par des cytokines inflammatoires, dont le TNF- α , l'IL-1, et surtout l'IL-6. Ces cytokines sont synthétisées en grandes quantités dans l'AR (Brull *et al.*, 2003).

Les niveaux de CRP des rats de GCA ont augmenté de manière significative ($p < 0.01$) (5.62 ± 0.20 mg/ml) par rapport à ceux trouvés chez les rats de GCN (4.87 ± 0.39 mg/ml). Cependant, le traitement des rats arthritiques avec l'Ehm a provoqué une faible réduction des taux de CRP pour les rats traités avec 50 mg/kg/j (5.025 ± 0.18 mg/ml) et une réduction significative ($p < 0.01$) pour les rats traités avec 100 mg/kg/j (4.68 ± 0.74 mg/ml).

➤ Effet de l'Ehm sur les paramètres hématologiques

Les résultats de la formule et la numération sanguine (tableau 8) ont montré une augmentation significative ($p < 0.001$) des plaquettes (PLT) des rats de GCA par rapport aux rats de GCN. Cependant, le traitement avec l'Ehm (50 et 100 mg/kg/j) a montré une diminution significative ($p < 0.001$) du nombre de PLT par rapport aux GCA. Une diminution du nombre de globule blanc (GB) a été notée chez les rats traités avec une dose de 100 mg/kg, par rapport au GCA au 21^{ème} jour.

Le traitement par l'extrait avec les différentes doses a provoqué une augmentation du nombre de globules rouges (GR), du taux d'hémoglobine (Hb) et d'hématocrite (Hc) par rapport au GCA. Une diminution des niveaux de GR, de Hc et de Hb a été observée dans le GCA. Les changements hématologiques chez les rats arthritiques ont indiqué une anémie qui est considérée comme une complication extra-articulaire la plus courante dans l'AR (Singhai et Patil, 2021).

Les GB constituent la majeure partie de notre système immunitaire et leurs niveaux élevés représentent une stimulation du système immunitaire contre les micro-organismes pathogènes envahissants (**Banik et al., 2020**).

Nos résultats montrent une augmentation du nombre de GB et de PLT dans le groupe arthritique non traité par rapport aux groupes traités ; cette augmentation due à un système immunitaire hyperactif (**Akhtar et al., 2021**) et qui explique l'infiltration de cellules inflammatoires dans les articulations des rats immunisés avec du CII (**Mythilypriya et al., 2008**). Le traitement avec l'extrait de *P. harmala* restauré les niveaux normaux de GR, Hc, Hb, PLT et GB, ce qui montre ses effets immunomodulateurs. **Singhai et Patil (2021)**, ont montré aussi que la teneur en Hb était significativement réduite chez les rats arthritiques mais les extraits de *P. harmala* ont considérablement atténué l'état anémique chez les rats arthritiques.

Tableau 8 : Effet de l'EHm de *P. harmala* sur la formule et la numération sanguine dans l'étude préventive.

	GCA	GCN	50 mg/kg PC	100 mg/kg PC
GR (10¹²/L)	7.24 ± 0.34 [#]	9.14 ± 0.12 [*]	7.94 ± 0.09 ^{*/#}	7.51 ± 0.042 ^{*/#}
GB (10⁹/L)	9.53 ± 0.88 [#]	8.93 ± 0.94 [*]	9.42 ± 0.57 ^a	6.27 ± 0.55 ^{*/#}
Hb (g/dl)	12.91 ± 0.39 [#]	16.16 ± 0.28 [*]	13.47 ± 0.07 ^{*/#}	14.44 ± 0.11 ^{*/#}
Hc (%)	36.02 ± 0.83 [#]	45.21 ± 0.98 [*]	37.47 ± 0.14 ^{*/#}	40.85 ± 0.51 ^{*/^a}
PLT (10⁹/L)	1309 ± 43.9 [#]	834 ± 24.43 [*]	1295 ± 37.91 ^{*/#}	186 ± 42.05 ^{*/#}

GCA : groupe contrôle arthritique, GCN : groupe contrôle normal. Chaque valeur représente la moyenne ± SEM (n=8). (*) : Différence significative en comparaison avec GCA. (#) : Différence significative en comparaison avec GCN. (a) : non-significatif.

➤ Effet de l'EHm sur les cellules immunitaires

Une augmentation significative ($p < 0.05$) des cellules immunitaires est enregistrée chez les rats de GCA (lymphocyte : 51.00 ± 1.48 %, granulocytes : 39.96 ± 2.80 % et monocytes : 20.4 ± 2.01 %) en comparaison avec les rats de GCN (Lymphocyte : 50.31 ± 2.49 %, granulocytes : 35.89 ± 4.30 % et monocytes : 13.79 ± 2.62 %). Cependant, le traitement avec l'EHm de *P. harmala* (100 mg/kg/j) pendant 21 jours a diminué ces paramètres (35.57 ± 2.08 %, 30.7 ± 3.24 % et 8 ± 0.00 % pour les lymphocytes, les granulocytes et les monocytes, respectivement) (**figure 27**).

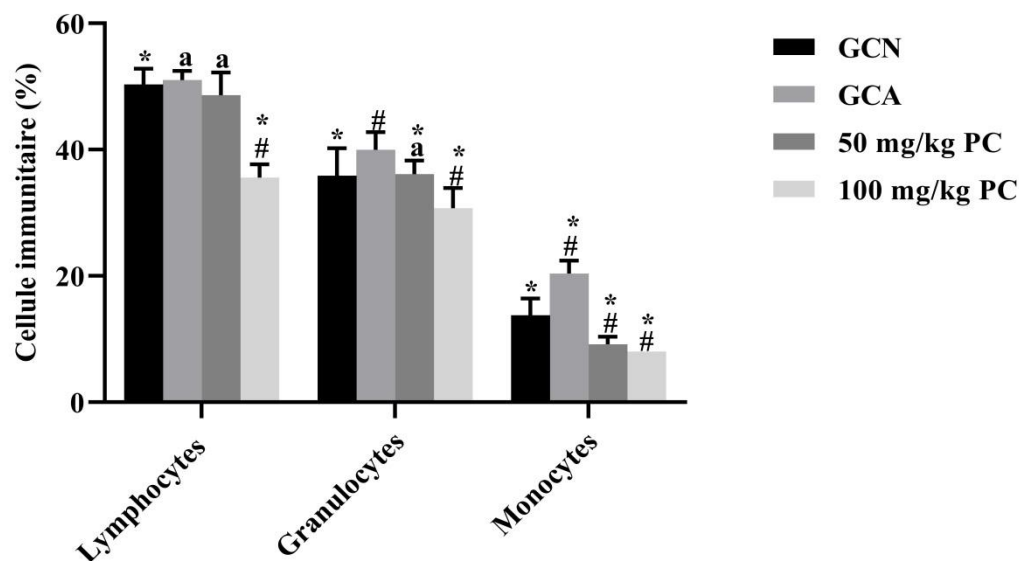


Figure 27. L'effet de l'Ehm de *P. harmala* sur les cellules immunitaires. GCA : groupe contrôle arthritique, GCN : groupe contrôle normal. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM. (*) : Différence significative en comparaison avec GCA. (#) : Différence significative en comparaison avec GCN. (a) : non-significatif.

La réaction inflammatoire dans l'AR implique la sensibilisation des cellules immunitaire par des neoantigène, provoquant ainsi la libération locale de facteurs chimiotactiques qui attirent les leucocytes. Ces dernier phagocytent ce complexe et libèrent des enzymes lysosomales, provoquant des lésions du cartilage et d'autres tissus. Des prostaglandines sont également libérées au cours de ce processus ; en particulier, il a été démontré que PGE2 et TXB2 augmentent dans l'arthrite provoqué par l'adjuvant chez le rat (Akhtar *et al.*, 2021). Le processus inflammatoire est caractérisé par une infiltration de cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles, lymphocytes T, B et NK) dans les articulations enflammées, conduisant à la prolifération de fibroblastes comme les synoviocytes (Polzer *et al.*, 2008). Les FLS, les cellules inflammatoires et les cellules T produisent des cytokines pro-inflammatoires (Vaillancourt *et al.*, 2011). En réponse à ces cytokines, les FLS produit des chimiokines, des métalloprotéinases (MMP), de la prostaglandine E2 (PGE2) et de la cycloxygénase-2 (COX-2) qui amplifient l'inflammation, l'hyperplasie et la destruction du cartilage et de l'os tissulaire (Hammaker *et al.*, 2007). La contribution de ces cellules à la destruction de l'os s'effectue par leur capacité à sécréter le RANKL "activateur du récepteur du NF-kB ligand" qui est la molécule clé dans la différenciation des ostéoblastes en ostéoclastes impliqués dans la destruction de l'os et du cartilage (Ishida *et al.*, 2009).

De plus, la relation entre l'inflammation et l'homéostasie osseuse est attribuée aux effets des cytokines ; une augmentation des taux de médiateurs pro-inflammatoires, notamment IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ et PGE2 est démontrée chez les rats arthritiques (**El Gazzar et al., 2006**). Le blocage de ces molécules a entraîné une réduction de la gravité de la maladie et de la résorption osseuse. Une diminution du niveau de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-4) est également rapportée chez les rats arthritiques, entraînant une destruction accrue du cartilage et des os (**El Gazzar et al., 2006**).

➤ Effet de l'EHm de *P. harmala* sur le score d'arthrite

Le suivi de l'œdème est l'un des principaux paramètres dans l'évaluation du degré de l'inflammation aiguë ou chronique et de l'efficacité du traitement utilisé. Les signes cliniques de l'arthrite, relatifs aux signes visuels d'inflammation (érythème et œdème), ont été recherchés dans les quatre pattes (avant et arrière) des rats des différents groupes. Chaque patte est observée séparément et un index arthritique (IA) lui est attribué allant de 0 (pas de signe clinique) à 4 (signe sévère) (**figure 28**).

Le traitement des rats avec l'EHm a entraîné une diminution très significative ($p < 0.001$) du score d'arthrite, par rapport à celui du GCA ; cette diminution était dose-dépendante. Les scores de l'arthrite ont évolué au cours du temps jusqu'à atteindre le 21^{ème} jour la valeur de 12.28 ± 1.42 pour le GCA, 7.71 ± 2.35 pour le groupe traité par 50 mg EHm/kg et 5.37 ± 1.55 pour le groupe traité par 100 mg EHm/kg (**figure 29**). **Singhai et Patil (2021)**, ont aussi trouvé que les groupes ayant reçu des extraits de *P. harmala* ont montré une réduction significative du volume des pattes par rapport au GCA dans le modèle d'ACF.

L'augmentation du volume des pattes est un indicateur physique de l'inflammation au début ainsi que dans la phase chronique de la maladie (**Andersen et al., 2004**). Dans cette étude, les rats atteints de l'arthrite ont développé un gonflement chronique dans plusieurs articulations en raison de l'infiltration des cellules inflammatoires, et l'épanchement de liquide de nature séreuse (l'exsudat). Il présentait des similitudes étroites avec l'arthrite rhumatoïde observée chez l'homme.

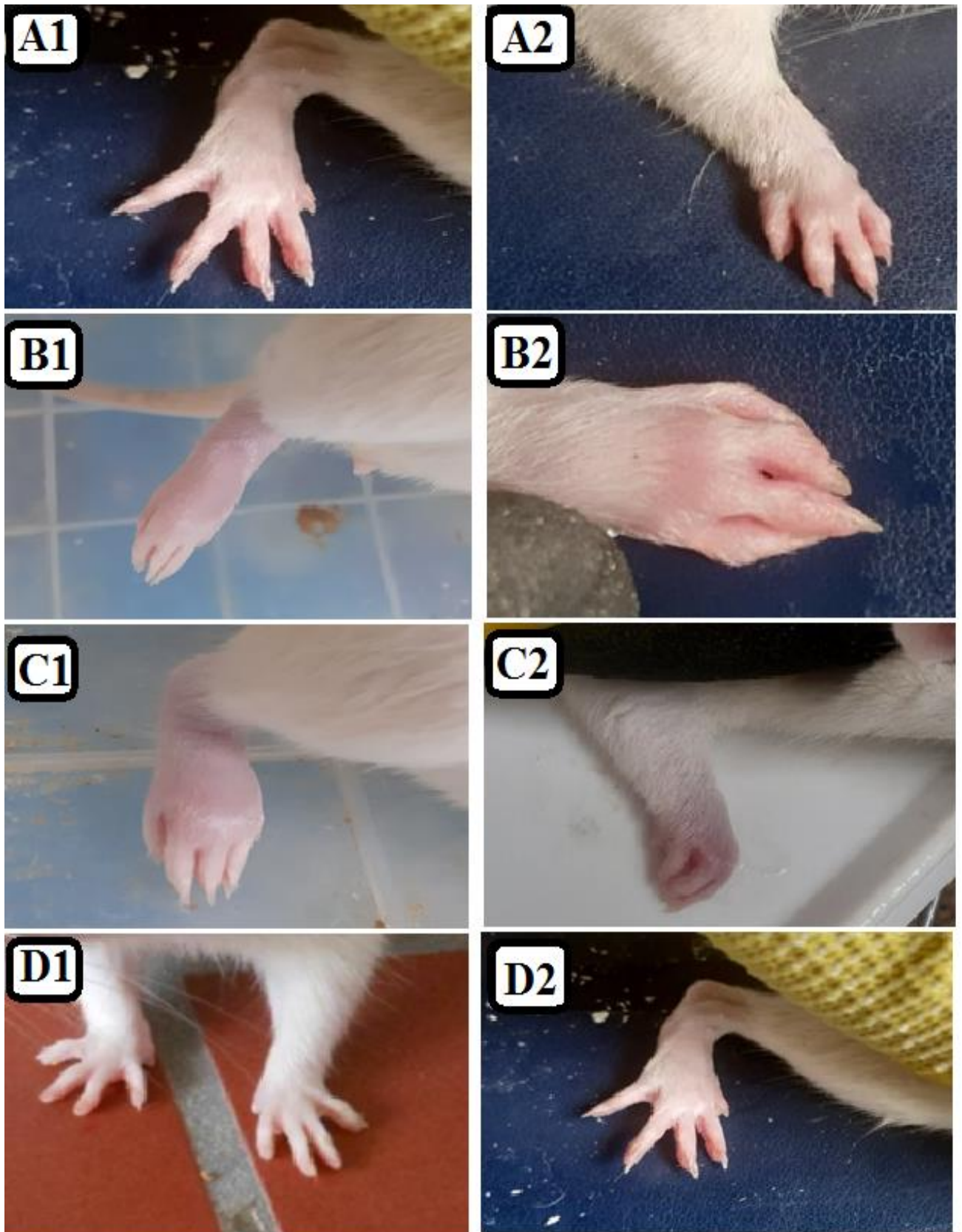


Figure 28. Signes cliniques d'arthrite observés après 21 jours d'induction de l'arthrite par le CII. A : score 0, B : score 3, C : score 4, D : groupe normal. 1 : patte avant, 2 : patte arrière.

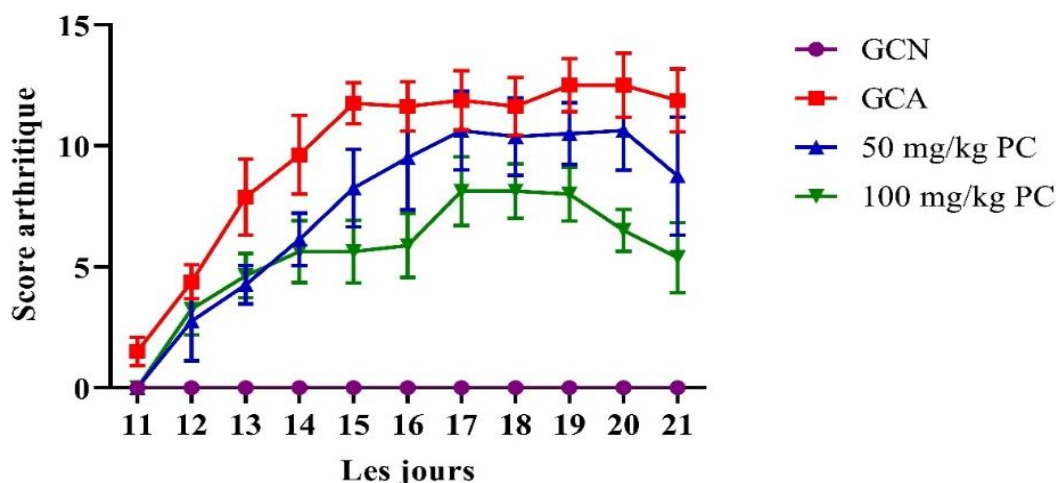


Figure 29. Evolution des signes cliniques (score arthritique) chez les rats des groupes préventifs traités avec des doses de 50 et 100 mg de l'Ehm de *P. harmala* /kg PC. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=8). GCA : groupe contrôle arthritique, GCN : groupe contrôle normal.

L'arthrite induite par le CII montre une augmentation du volume des pattes des rats arthritiques, ceci montre l'effet anti-inflammatoire de l'Ehm de *P. harmala* (50 et 100 mg/kg/j). Ces résultats expriment l'efficacité de l'Ehm dans la protection et la thérapie de l'AR induite par le CII. L'effet apaisant de l'Ehm sur l'œdème de la patte chez les rats arthritiques peut être dû à son action inhibitrice sur la libération de médiateurs inflammatoires, montrant son effet anti-inflammatoire dans l'arthrite induite par le CII (Singhai et Patil, 2021). Ces médiateurs affectent la libération de radicaux libres et d'autres médiateurs inflammatoires tels que le NO et la prostaglandine (PGE2) (Singhai et Patil, 2021). De nombreuses études ont rapporté que les composés phénoliques inhibent le processus inflammatoire via l'inhibition de l'enzyme cyclo-oxygénase impliquée dans la transformation de l'acide arachidonique en médiateurs inflammatoires (Kanathip et al., 2020).

➤ **L'effet de l'Ehm sur la vitesse de sédimentation des globules rouges**

Les rats du GCA ont montré un taux de VS plus élevé (après 1 h : 3.35 ± 0.69 mm et après 2 h : 6.78 ± 1.11 mm) par rapport aux rats de GCN (après 1h : 2.31 ± 0.33 mm et après 2 h : 4.68 ± 0.57 mm). Les groupes traités avec l'Ehm ont réduit significativement ($p < 0.01$) la vitesse de sédimentation après 21 jour (après 1 h : 2.5 ± 0.26 mm et après 2 h : 5.25 ± 0.41 mm chez les rats traités avec 50 mg/kg/j) et (après 1h : 2.25 ± 0.49 mm et après 2h : 4.87 ± 0.81 mm chez les rats traités par 100 mg/kg/j).

Singhai et Patil (2021) ont également trouvé une diminution de la VS des groupes traité par l'EHe de *P. harmala* par rapport aux rats arthritiques. La VS est une mesure de la réponse chronique dans l'AR et d'autres maladies rhumatismales (**Lessing et Delmenico, 2007**). L'inflammation chronique sont parmi les causes de l'augmentation de la sédimentation des globules rouges (**Patel et Shah, 2013**). Son ascension est notamment liée à l'augmentation du taux de protéines de l'inflammation dont le fibrinogène, qui se fixe à la surface des globules rouges, neutralisant leurs charges négatives, favorisant l'agrégation entre elles et augmentant leur vitesse de sédimentation.

3.7.2. Etude curative

➤ Effet de l'EHe de *P. harmala* sur le poids corporel

Un suivi régulier des animaux nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le **tableau 9**. Au début de l'expérience, les rats ont un poids homogène. A la fin de l'étude curative, une différence significative ($p < 0.001$) de poids corporel est observée entre le GCA et le GCN. L'extrait de *P. harmala* a amélioré la gain de poids corporel, en particulier le groupe reçu 100 mg/kg par rapport au groupe arthritique.

Tableau 9 : Effet de l'EHe de *P. harmala* sur le poids des rats arthritiques.

Traitement	GCA	GCN	50 mg/kg PC	100 mg/kg PC	GRf
1^{ère} immunisation	200.7 ± 0.88 ^a	200.75 ± 7.91 ^a	200.1 ± 8.08 ^a	200.87 ± 4.60 ^a	200 ± 0.00 ^a
4 jours	222.5 ± 5.53 [#]	211.62 ± 3.70 [*]	248.7 ± 7.42 ^{*/#}	241.25 ± 6.66 ^{*/#}	192.83 ± 2.58 ^{*/#}
2^{ème} immunisation	219.8 ± 5.32 [#]	174.12 ± 6.09 [*]	166.1 ± 8.08 ^{*/a}	201.42 ± 0.49 ^{*/#}	185.83 ± 3.24 ^{*/a}
10 jours	169.7 ± 5.65 [#]	180.87 ± 6.82 [*]	174.1 ± 4.6 ^{*/a}	186 ± 3.79 ^{*/a}	182 ± 2.61 ^{*/a}
14 jours	160.1 ± 6.09 ^a	174.37 ± 6.91 [*]	169.3 ± 4.58 ^a	179.62 ± 4.05 ^{*/a}	179.6 ± 2.40 ^{*/a}
17 jours	163.7 ± 3.63 ^a	176.87 ± 7.01 [*]	172 ± 5.13 ^{*/a}	174.25 ± 3.63 ^{*/a}	178.83 ± 2.88 ^{*/a}
21 jours	168.7 ± 4.03 [#]	177.50 ± 6.76 [*]	161.8 ± 4.48 ^a	165.25 ± 3.89 ^a	174.66 ± 5.16 ^a
24 jours	163.7 ± 3.63 ^a	163.33 ± 8.55 ^a	162 ± 2.94 ^a	148.1 ± 19.2 ^{*/#}	174.1 ± 6.14 ^{*/a}
27 jours	165.14 ± 3.8	179.66 ± 7.51 [*]	168.12 ± 5.17 ^a	166.12 ± 4.5 ^{a/#}	173.16 ± 6.2 ^{*/a}
30 jours	164 ± 2.24	183 ± 8.72 [*]	163.37 ± 5.8 ^{a/#}	172.62 ± 5.025 ^a	177.83 ± 6.9 ^{*/a}
33 jours	168.5 ± 4.76 [*]	188.1 ± 7.38 [*]	172.7 ± 5.33 ^{*/#}	172.75 ± 5.33 ^a	181.6 ± 7.02 ^{*/a}
36 jours	172.5 ± 5.22 [*]	189.83 ± 7.53 [*]	173.62 ± 6.90 ^a	172.3 ± 4.94 ^{a/#}	181.3 ± 8.07 ^{*/a}
42 jours	170.2 ± 5.79 [*]	196 ± 8.07 [*]	183.5 ± 11.2 ^{*/a}	190.85 ± 6.05 ^{*/a}	188 ± 8.19 ^{*/#}

(*) : Différence significative en comparaison avec GCA. (#) Différence significative en comparaison avec GCN. (a) : non-significatif. GCA : groupe contrôle arthritique, GCN : groupe contrôle normal, GRf : groupe de référence.

➤ L'effet de l'EHm de *P. harmala* sur la CRP

Les niveaux de la protéine C réactive chez les rats arthritiques non traité ont augmenté de manière significative (6.48 ± 0.52 mg/ml) par rapport aux niveaux trouvés chez les rats normaux (4.75 ± 0.39 mg/ml) et le groupe de référence (5.75 ± 0.57 mg/ml). Cependant, le traitement des rats arthritiques avec l'EHm de *P. harmala* a provoqué une réduction significative des taux de CRP chez les rats traités avec 50 mg/kg (5.1 ± 0.20 mg/ml) et les rats traités avec 100 mg/kg (3.93 ± 0.46 mg/ml) (**figure 30**).

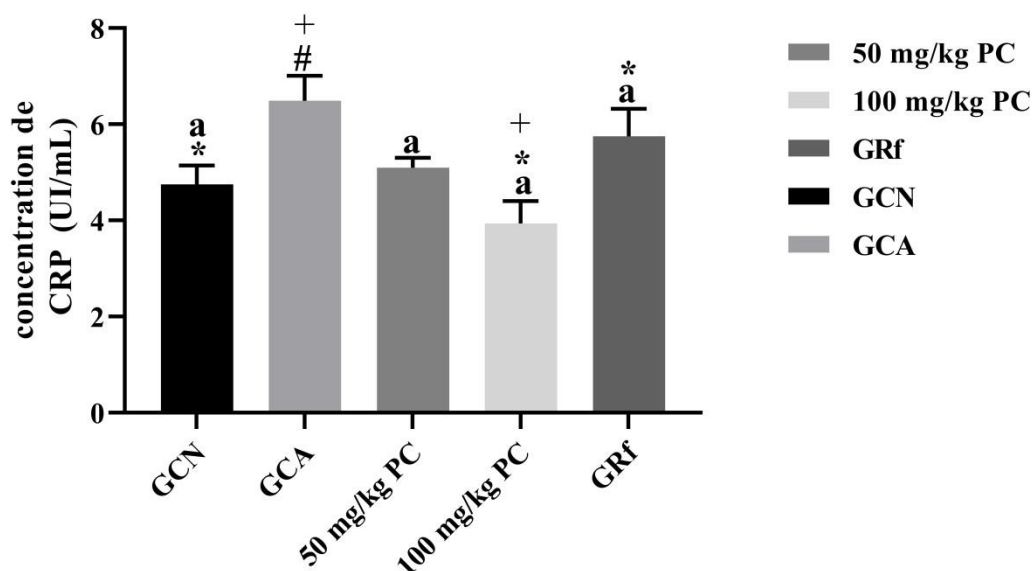


Figure 30. Les niveaux de la protéine C réactive dans le sérum des rats des groupes curatifs traités avec les doses de 50 et 100 mg de l'EHm/kg. GCA : groupe contrôle arthritique, GCN : groupe contrôle normal, GRf : groupe de référence. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=8). (*) : Différence significative en comparaison avec GCA. (#) Différence significative en comparaison avec GCN. (+) : Différence significative en comparaison avec GRf. (a) : non-significatif.

➤ Effet de l'EHm sur les paramètres hématologiques

Le nombre de PLT ont été significativement augmentés ($p < 0.001$) chez les rats de GCA ($1079.2 \pm 23.18 \times 10^9/L$) par rapport aux rats de GCN ($993.64 \pm 83.31 \times 10^9/L$).

Cependant, le traitement avec l'EHm (100 mg/kg/j) a montré une réduction significative ($p < 0.001$) de nombre de plaquette ($948.71 \pm 41.43 \times 10^9/L$) ; par rapport aux rats de GCA (**tableau 10**). Le traitement avec l'EHm de *P. harmala* a également provoqué une diminution significative ($p < 0.01$) du nombre de GB par rapport aux rats de GCA. Dans la présente étude, il existe également une différence significative dans le nombre de GR, de Hb, et de Hc des groupes traités par rapport au GCA.

Tableau 10 : Effet de l'EHm de *P. harmala* sur la formule et la numération sanguine.

Paramètre	GCA	GCN	50 mg/kg	100 mg/kg	GRf
GR ($10^{12}/L$)	$7.3 \pm 0.11^{a/+}$	$7.42 \pm 0.09^{a/+}$	$7.70 \pm 0.01^{*/a}$	$7.81 \pm 0.09^{*/a}$	$8.06 \pm 0.08^{*/\#}$
GB ($10^9/L$)	$7.94 \pm 0.95^{\#/ +}$	$4.82 \pm 0.37^{*/a}$	$7.59 \pm 0.45^{a/\#/+}$	$7.31 \pm 0.50^{a/\#/+}$	$5.73 \pm 0.32^{*/a}$
Hb (g/dl)	$13.45 \pm 0.17^{\#}$	$13.8 \pm 0.17^*$	$13.7 \pm 0.2^{*/a}$	$13.82 \pm 0.14^{*/a}$	$14.81 \pm 0.7^{*/\#}$
Hc (%)	$36.95 \pm 0.60^{\#/ +}$	$37.2 \pm 0.70^{*/+}$	$37.13 \pm 0.5^{*/a}$	$37.62 \pm 0.45^{*/\#/a}$	$39.41 \pm 0.83^{*/\#}$
PLT ($10^9/L$)	$1079 \pm 23.18^{\#/ +}$	$993.6 \pm 83.3^{*/a}$	$1058 \pm 19.8^{a/\#/+}$	$948.7 \pm 41.4^{*/a/+}$	$961.21 \pm 33.3^{*/a/+}$

GCA : groupe contrôle arthritique, GCN : groupe contrôle normal, GRf : groupe de référence. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=8). (*) : Différence significative en comparaison avec GCA. (#) Différence significative en comparaison avec GCN. (+) : Différence significative en comparaison avec GRf. (a) : non-significatif.

➤ L'effet de l'EHm de *P. harmala* sur les cellules immunitaires

Une augmentation significative des granulocytes et une diminution des lymphocytes et des monocytes sont enregistrées chez les rats de GCA par rapport aux rats de GCN. Cependant, le traitement avec l'EHm (50 et 100 mg/kg/j) a réduit le nombre des granulocytes de manière dose-dépendante et a permis de les restaurer et de les maintenir à des valeurs similaires à celles du GCN et de GRf (**figure 31**).

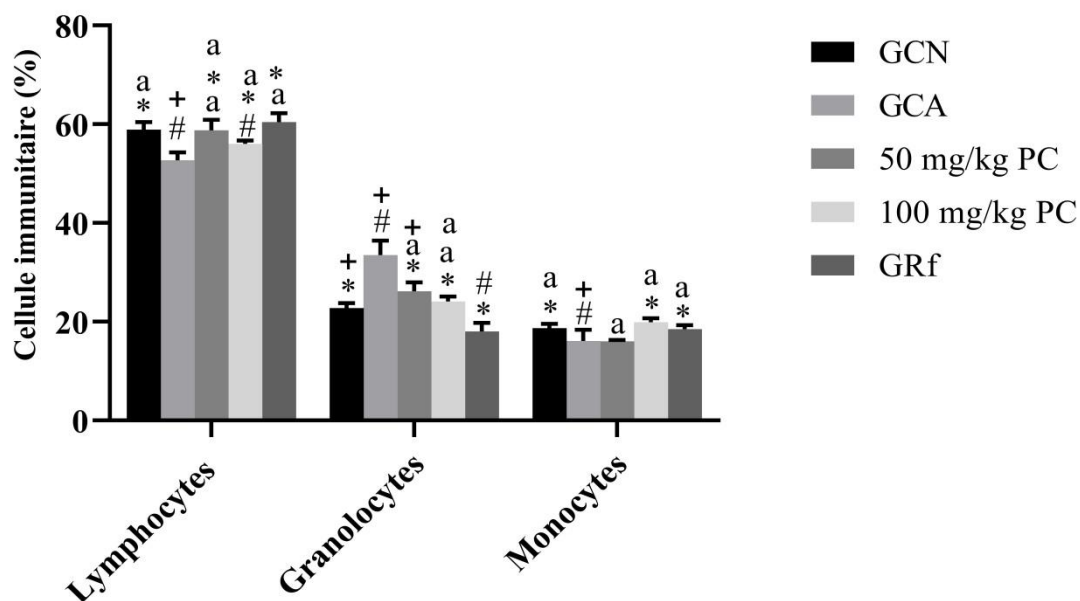


Figure 31 : Effet de l'EHm sur les cellules immunitaires dans le sang des groupes traités avec les doses de 50 et 100 mg/kg. GCA : groupe contrôle arthritique, GCN : groupe contrôle normal, GRf : groupe de référence. Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM (n=8). (*): Différence significative en comparaison avec GCA. (#) Différence significative en comparaison avec GCN. (+) : Différence significative en comparaison avec GRf. (a) : non-significatif.

➤ Effet de l'EHm sur le score de l'arthrite

Le traitement curatif avec l'EHm commençant le 14^{ème} jour après la 1^{ère} immunisation a réduit la sévérité du gonflement et l'érythème à la fin de l'expérience et a entraîné une diminution très significative ($p < 0.001$) du score d'arthrite, par rapport à celui de GCA ; cette diminution est dose-dépendante.

Le score de l'arthrite a évolué dans le temps jusqu'à atteindre au 30^{ème} jour la valeur de 12.42 ± 1.28 pour le GCA, et pour les groupes traités avec 50 mg/kg/j (9.125 ± 1.43) et avec 100 mg/kg /j (7.35 ± 1.30) et 8 ± 1.28 pour le GRf. Ensuite, ce score d'arthrite a diminué avec le temps jusqu'à atteindre au 40^{ème} jour la valeur de 12.42 ± 1.30 (GCA), 5.25 ± 1.72 (50 mg d'EHm/kg), 3.75 ± 0.95 (100 mg/kg) et 3 ± 1.24 (GRf) (**figure 32**).

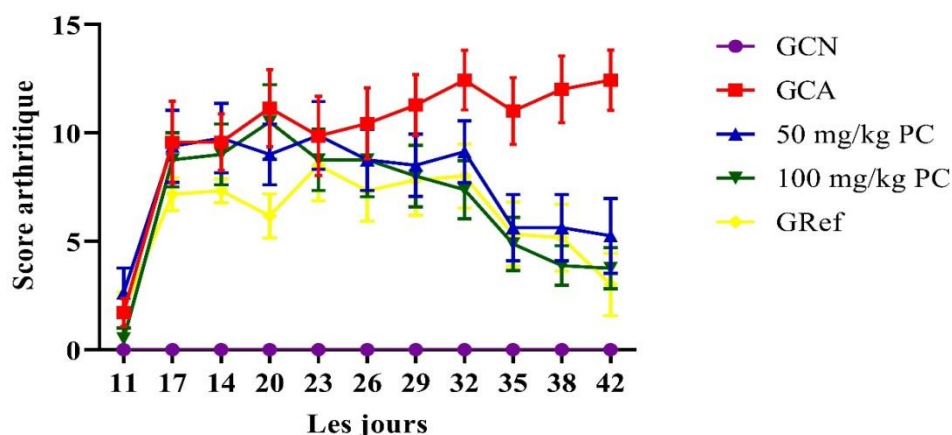


Figure 32. Evolution de score arthritique chez les rats des groupes curatifs traités avec 50 et 100 mg de l'EHm de *P. harmala* /kg PC, de GCA (groupe contrôle arthritique), de GCN (groupe contrôle normal) et de GRf (groupe de référence).

➤ **L'effet de l'EHm sur la vitesse de sédimentation des globules rouges**

Le niveau de VS montre une différence significative entre les rats du groupe arthritique non traité (après 1 h : 4 ± 0.32 mm et après 2 h : 5.25 ± 0.79 mm) et le groupe traité avec le médicament de référence (après 1 h : 2.25 ± 0.31 mm et après 2 h : 4.62 ± 0.46 mm) et avec l'EHm à différentes doses administrées (après 1 h : 3.87 ± 0.47 mm et après 2 h : 5 ± 0.26 mm pour 50 mg/kg/ j) et (après 1 h : 2.625 ± 0.18 mm et après 2 h : 4.25 ± 0.25 mm pour 100 mg/kg/j) (**figure 33**).

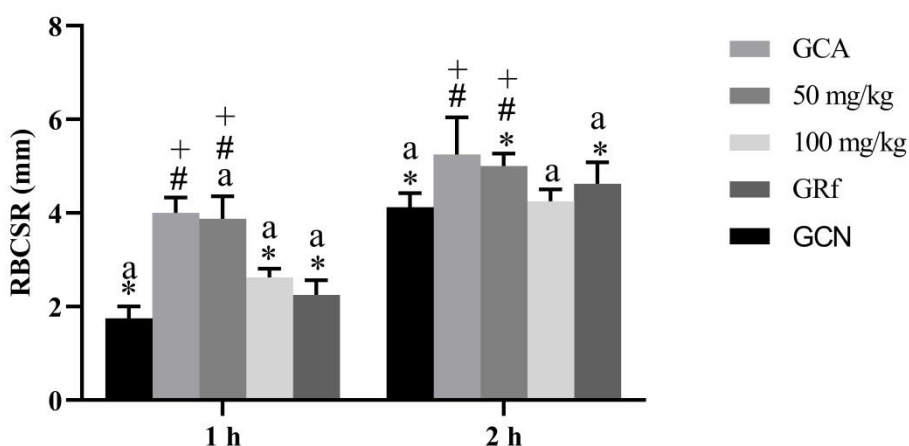


Figure 33. Vitesse de sédimentation des groupes traités avec l'EHm, GCA (groupe contrôle arthritique), GCN (groupe contrôle normal) et le GRf (groupe de référence). Chaque valeur représente la moyenne de trois tests \pm SEM (n=8). (*) : Différence significative en comparaison avec GCA. (#) Différence significative en comparaison avec GCN. (+) : Différence significative en comparaison avec GRf. (a) : non-significatif.

➤ Etude histologique

Les coupes histologiques de pattes des rats sont présentées dans la **figure 34**. Les résultats obtenus montrent une déformation sévère des articulations des rats arthritiques, ce qui donne une perte de cartilage articulaire et l'érosion de l'os en comparaison avec le groupe normal. Chez les rats arthritiques, la prolifération de la membrane synoviale est bien visible. La membrane synoviale est enflammée conduisant ainsi à la formation du pannus inflammatoire avec une infiltration des cellules inflammatoires. Cette observation explique bien les raisons de la lourdeur remarquée dans le mouvement des rats arthritiques.

Le traitement des rats avec l'Ehm de *P. harmala* montre une amélioration dose dépendante de l'architecture des articulations. Cette amélioration traduite par une diminution de la sévérité de la destruction de l'os et du cartilage avec une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires, de plus une inhibition de dégradation de cartilage et de l'os a été observée.

Les articulations des rats traités avec 100 mg/kg/j révèlent une architecture proche à celle des articulations des rats normaux. La même chose a été observée dans le groupe traité par le médicament de référence. Le traitement préventif et curatif par l'Ehm de *P. harmala* a montré des effets bénéfiques sur ces dernières manifestations pathologiques où on n'a observé une diminution importante des signes de l'inflammation.

L'étude de **Singhai et Patil (2021)**, ont montré que les rats du GCN ont présenté une hyperplasie synoviale et une dégénérescence du cartilage. L'infiltration d'exsudats inflammatoires dans la région articulaire avec destruction de la moelle osseuse et la formation de pannus a également été observée, par rapport au GCN.

Les groupes arthritiques traités par le *P. harmala* ont montré un effet protecteur car moins de caractéristiques inflammatoires ont été observées. Elles sont comparables au groupe traité avec un médicament standard qui montre un architecteur normal et des exsudats inflammatoires moindres. Une infiltration faible des cellules immunitaire dans les groupes traité par l'extrait ce qui illustre leur rôle préventif.

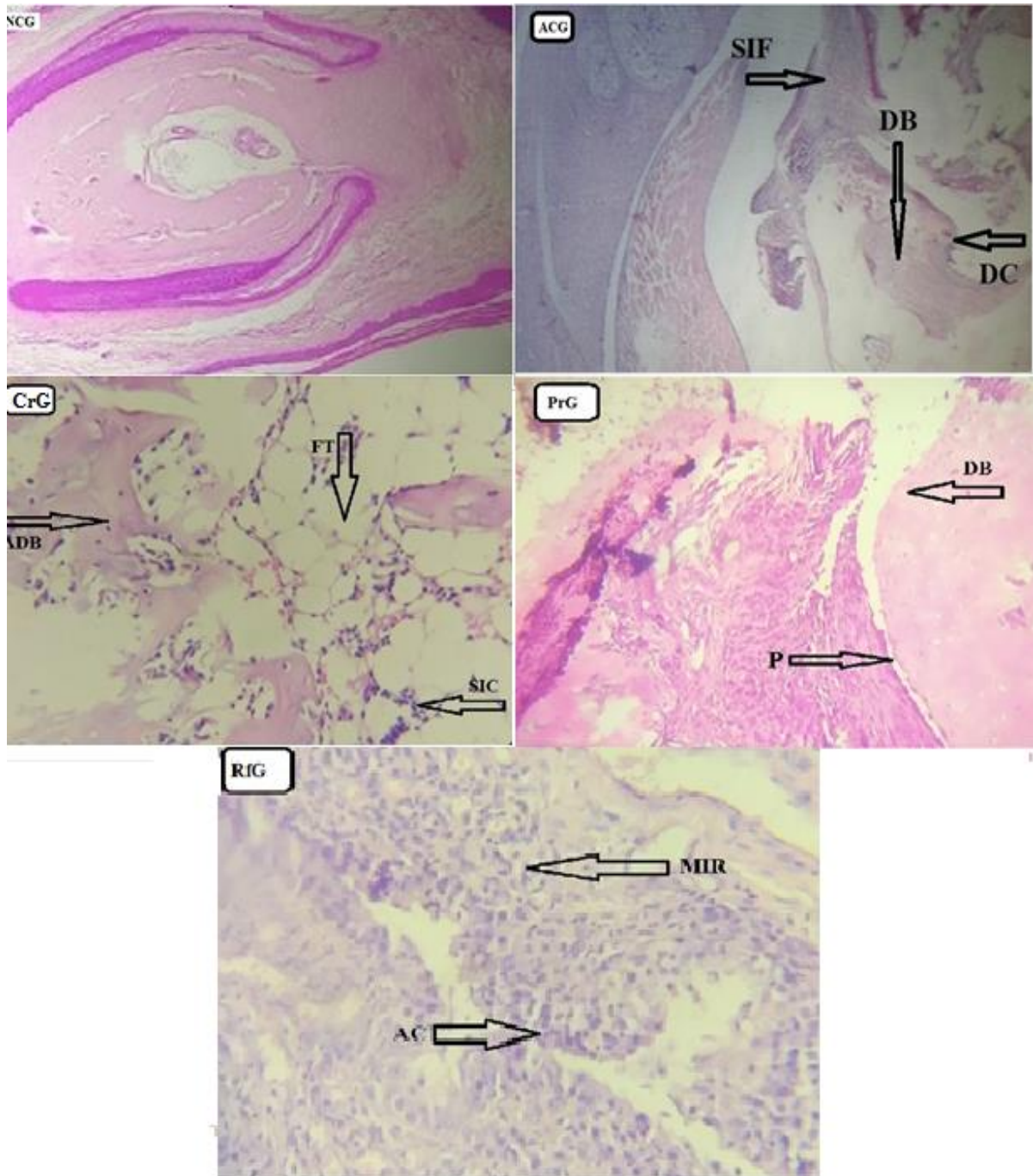


Figure 34. Coupes histologiques des articulations des rats arthritiques, normaux et traitées avec l'Ehm de *P. harmala* L. (X 40). ACG : groupe contrôle arthritique ; NCG : groupe contrôle normale ; GRf : groupe référence. D1 : 50 mg/kg PC/j ; D2 : 100 mg/kg PC/j. BD: os détruit ; AC : cartilage amélioré ; C : cartilage ; B : os ; SIF : fibrose inflammatoire sévère ; DB : os détruit ; DC : cartilage détruit ; ISM : membrane synoviale enflammée ; P: pannus ; FT : tissu adipeux ; SIC : légères modifications inflammatoires ; BR : remodelage osseux ; MO : moelle osseuse ; MIR : remodelage inflammatoire modéré ; Pré : préventif ; Cur : curatif.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Peganum harmala L. est une plante très utilisée en médecine traditionnelle Algérienne pour traiter plusieurs maladies telque les maladies rhumatismales, elle possède également des propriétés antiparasitaires, antitumorales et anti-inflammatoires.

Le présent travail a porté sur l'évaluation de la capacité de *Peganum harmala* L. à restaurer et/ou de limiter la destruction du cartilage articulaire à des fins préventives et curatives. Parallèlement, l'étude de la toxicité de *P. harmala* pour analysé leur profile de sécurité, afin de l'utilisé comme une nouvelle molécule à un intérêt thérapeutique. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à valoriser les vertus de cette plante par la caractérisation phytochimique, l'évaluation de ses propriétés antioxydante, cytotoxique et anti-inflammatoire.

Dans la présente étude, l'extraction aqueuse et alcoolique suivis d'une estimation quantitative des métabolites secondaires indiquent la richesse des graines de *P. harmala* en polyphénols totaux, en flavonoïde et en flavonols.

Afin de garantir l'innocuité de l'Ehm, nous avons effectué une étude toxicologique aiguë et chronique par voie orale. Après administration orale de l'Ehm, aucune mortalité et aucune signes de toxicité n'ont été constatés pour les doses ≤ 300 mg/kg PC. En revanche, il y à des mortalités pour les groupes traité par 500-800 et 2000 mg Ehm/kg PC. La DL_{50} nous a permis de classer l'Ehm de *P. harmala* L. (501.47 mg/kg PC) dans la catégorie des substances modérément toxique selon l'échelle de Hodge et Sterner.

Toutefois, le traitement chronique des rats pendant 90 jours a révélé après l'administration orale de trois doses différentes (100, 200 et 300 mg/kg/j) de l'Ehm de *P. harmala*, aucun signe de toxicité sur le comportement, l'évolution du poids total, le poids des organes des rats traitées, ni les paramètres biochimiques et hématologiques, de même pour l'histologie hépatique, à l'exception de quelques changement dans les niveaux de l'urée et de la créatinine plasmatique et dans le nombre de plaquettes.

L'activité antioxydante des extraits de *P. harmala* a été étudié par six tests (Capacité antioxydante totale, Piégeage du radical DPPH et ABTS^{•+}, pouvoir réducteur, chélation du Fer et β -carotène), les résultats ont montré que l'Ehm et l'EHe ont exhibé un potentiel antioxydant le plus important, l'EAq et l'EDc se sont révélés moins efficaces. Par conséquent, une approche *in vivo* a été réalisée pour étayer les résultats d'activité

antioxydante démontrés *in vitro*. Les effets *in vivo* démontrent la capacité de l'EHm à améliorer le statut des marqueurs du stress oxydatif (CAT, GSH, MDA).

L'EHm et l'EET ont induit une diminution significative de la viabilité cellulaire et ont présenté une $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/ml}$ pour les cellules *HeLa*, nous pouvons donc les considérer comme une source active et potentielle de molécules cytotoxiques envers les cellules tumorale et pseudotumorale.

Les résultats de l'étude *in vitro* confirmée que l'EHm est l'extrait le plus actif parmi tous les extraits.

L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire des extraits de *P. harmala* ont montré une capacité importante à inhiber la dénaturation de BSA. De plus, ces extraits sont efficacement réduits l'inflammation aiguë induite par le xylène. L'effet antiarthritique réalisés sur les rats Wistar a prouvé l'efficacité de la plante étudiée contre l'arthrite. Ce travail a prouvé l'effet de l'EHm dans le traitement de l'arthrite induite chez le rat.

Sur la base des résultats actuels, nos futurs travaux et perspectives permettent d'évaluer de nombreux sujets :

- Isolement, caractérisation et identification des composés actifs présents dans les extraits de *P. harmala* par des méthodes spécifiques et l'étude de leurs effets isolément.
- L'extraction des alcaloïdes à partir des graines de *Peganum harmala* L.
- La recherche et le dosage des anticorps anticollagène.
- L'effet possible des extraits de *P. harmala* sur l'action des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le $TNF\alpha$ et l'IL-17.
- Comprendre les mécanismes de l'activité anti-inflammatoire en effectuant des essais d'inhibition enzymatique et de dosage des médiateurs inflammatoires.
- La réalisation des études pharmacocinétiques et pharmacodynamiques pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus préventifs et curatifs des substances actives.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abbas MW, Hussain M, Qamar M, Ali S, Shafiq Z, Wilairatana P, Mubarak MS.** (2021). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of *Peganum harmala* extracts An *In Vitro* and *In Vivo* Study. *Molecules*. 26: 6084.
- Abdelfattah AFM, Matsumoto K, Gammaz HAK, Watanabe H.** (1995). Hypothermic effect of *Peganum harmala* alkaloid in rats. Involvement of serotonergic mechanism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 52: 421–426.
- Abolhasani L, Salehi EA, Kenari RE.** (2015). Capacity and Stability of Phenolic Compounds from the Seeds of *Peganum harmala*. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. 4(11S): 218-222.
- Achour S, Saadi H, Turcant A, Banani A, Mokhtari A, Soulaymani A, Bencheikh RS.** (2012). Intoxication au *Peganum harmala* L. et grossesse : deux observations marocaines. *Médecine et Santé Tropicales*. 22(1): 84-86.
- ACR: American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines.** (2002). Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis & Rheumatism*. 46(2): 328-346.
- Adda L, Melhem SA, et Pol J.** (2020). Le jeûne réduit l'inflammation associée aux maladies inflammatoires chroniques sans altérer la réponse immunitaire aux infections aiguës. *Médecine Sciences*. 36(6-7): 665-668.
- Akhtar MF, Raza SM, Saleem A, Hamid I, Ashraf Baig MMF, Sharif A, Sohail K, Javaid Z, Saleem U, Rasul A.** (2022). Appraisal of Anti-Arthritic and Anti-Inflammatory Potential of Folkloric Medicinal Plant *Peganum harmala*. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*. 22(1): 49-63(15).
- Akhtar MF, Raza SA, Saleem A, Hamid I, Faran Ashraf Baig MM, Sharif A, Sohail K, Javaid Z, Saleem U, Rasul A.** (2021). Appraisal of Anti-Arthritic and Anti-Inflammatory Potential of Folkloric Medicinal Plant *Peganum Harmala*. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 21: 1-00.
- Alani WK, Alqudah AA, Tarawneh KA.** (2021). Antibacterial and Antioxidant Activities of Ethanol Extracts of Some Plants Selected from South Jordan. *Pharmacognosy Journal*. 13(2): 528-534.
- Aletaha D and Ramiro S.** (2018). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *Journal of the American Medical Association*. 320: 1360–1372.
- Aljoboury BA, Alta'ee1 AH, Alrubaie SJ.** (2020). Association of Oxidative Stress and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis Patients in Babylon Province. *Medico-legal Update*. 20(2): 565-569.
- Allaq AA, Sidik NJ, Abdul-Aziz A and Ahmed A.** (2021). Antioxidant, Antibacterial, and Phytochemical Screening of Ethanolic Crude Extracts of Libyan *Peganum harmala* Seeds. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 33(13): 74-82.
- Al-Mekhlafi FA, Abutaha N, Alhaga SK and Al-Wadaan M.** (2022). Effects of *Peganum harmala* L. Seed Extract on *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Brazilian Journal of Biology*. 82: e241338.
- Alpízar-Rodríguez D, Pluchino N, Canny G, Gabay C, Finckh A.** (2017). The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 56(8): 1254-1263.

- Alvarado-Sansininea JJ, Sánchez-Sánchez L, López-Muñoz H, Escobar ML, Flores-Guzmán F, Tavera-Hernández R, Jiménez-Estrada M.** (2018). Quercetagenin and patuletin: Antiproliferative, necrotic and apoptotic activity in tumor cell lines. *Molecules*. 23: 2579.
- Amany AA, Mahmoud SA, Sabiha E, Amira AEE.** (2012). Effect of atorvastatin with or without prednisolone on Freund's adjuvant induced-arthritis in rats. *European Journal of Pharmacology*. 676(1-3): 34–40.
- Amarowicz R, Estrella I, Hernández T, Robredo S, TEROzyska A, Kosinska A, & Pegg RB.** (2010). Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*. 121: 705-711.
- Andallu B, Shankaran M, Ullagaddi R, Allagadda VK.** (2011). Efficacy of curry (*Murraya koenigii*) leaves in scavenging free radicals in vitro and controlling oxidative stress *in vivo*. *Biomedicine and Preventive Nutrition*. 1(4): 263-267.
- Andersen LA, Ibfelt HH, Christensen K, et al.** (2000). Randomized, placebo-controlled, cross-over study of ginger extracts and ibuprofen in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 8(1): 9.
- Andersen ML, Santos EH, Seabra MDL, Silva DA, Tufik S.** (2004). Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 91(2): 325-330.
- Aniszewski T.** (2007). Definition, Typology and Occurrence of Alkaloids. In: Alkaloids - Secrets of Life. *Elsevier* (Amsterdam): 1-59.
- Aouachria S, Boumerfeg S, Benslama A, Benbacha F, Guemmez T, Khennouf S, Arrar L, Baghiani A.** (2017). Acute, sub-acute toxicity and antioxidant activities (*in vitro* and *in vivo*) of *Reichardia picroide* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 208 : 105-116.
- Aouadhi S.** (2010). Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle étude De 57 plantes recommandées par les herboristes : 15-166.
- Arrar L, Diafet A, Charef N, Khennouf S, and Baghiani A.** (2013). Preventive and curative effect of the methanolic extract of *Ajuga iva* on collagen induced arthritis in rats. *Pharmacognosy Communications*. 3 (2): 1-7.
- Arrar L, Derradji Y, Rouba K, Hanachi N, Charef N, Bouriche H, Boumerfeg S et Baghiani A.** (2008). Induction de l'arthrite rhumatoïde chez le rat wistar par le collagène type II. *Archives de l'Institut Pasteur d'Algérie*. 134-147.
- Asadzadeh R, Abbasi N, Bahmani M.** (2021). Extraction and Identification of Chemical Compounds of *Peganum harmala* L. Seed Essential Oil by HS-SPME and GC-MS Methods. *Traditional and integrative medicine*. 6(3): 229-235.
- Asgarpanah J and Ramezanloo F.** (2012). Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 6(22): 1573-1580.
- Ashley C.** (2004). Renal failure: how drugs can damage the kidney. *Royal Free Hamstead NHS Trust*. 11: 48–53.
- Atouf O, Benbouazza K, Brick C, Bzami F, Bennani N, Amine B, Hajja-Hassouni N, Essakali M.** (2008). HLA polymorphism and early rheumatoid arthritis in the Moroccan population. *Joint Bone Spine*. 75: 554-558.

- Atrooz O, Wietrzyk J, Filip-Psurska B, Al-Rawashdeh I, Soub M and Abukhalil MH.** (2018). Antiproliferative, antioxidant, and antibacterial activities of crude plant extracts of *Asphodeline lutea* L. and *Peganum harmala* L. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 7 (11): 148-167.
- Aviña-Zubieta JA, Choi HK, Sadatsafavi M, Etminan M, Esdaile JM, Lacaille D.** (2008). Risk of cardiovascular mortality in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Arthritis & Rheumatolog*. 59(12): 1690-1697.
- Avouac J, Amrouche F, Meune C, Rey G, Kahan A, Allanore A.** (2017). Mortality profile of patients with rheumatoid arthritis in France and its change in 10 years. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 46(5): 537-543.
- Baclé M.** (2012). La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte, place et rôle du pharmacien d'officine dans sa prise en charge et la délivrance des biothérapies à l'officine. Thèse de Doctorat en pharmacie. U.F.R. de médecine-pharmacie de Rouen, France.
- Baghiani A, Djarmouni M, Boumerfeg S, Hayet T, Charef N, Khennouf S, Arrar L.** (2012). Xantine oxidase inhibition and antioxidant effects of *Peganum harmala* seeds extracts. *European Journal of Medicinal Plants*. 2: 42–56.
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, Brunet C, Din T, Vasseur J, Gazin JC, Pinkas M, Luyckx M, Gazin M.** (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extract from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparation. *Arzneimittel-forschung/Drug Research*. 46(2): 1086 – 1089.
- Banik PP, Saha S, Kim KD.** (2020). An Automatic Nucleus Segmentation and CNN Model based Classification Method of White Blood Cell. *Expert Systems with Applications*. 149 : 113211.
- Batteux F & Weill B.** (2003). Immun-pathologie et réactions inflammatoires. *Ed, Boeck*: 71.
- Bedina S, Trofimenko A, Mozgovaya E, Mamus M, Spitsina S.** (2021). Ab0049 relationship of rheumatoid factor and xanthine oxidoreductase enzymatic constituents in several blood compartments of rheumatoid arthritic patients. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 80(1): 1057.
- Behidj-Benyounes N, Dahmane T, Aknouche F, Demmouche K.** (2015). Screening phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des alcaloïdes des feuilles de *Peganum harmala* L. récoltées dans la région de M'SILA. *Sciences & Technologie C*. 42 : 21-30.
- Benard C.** (2009). Polyarthrite rhumatoïde. Clinique et diagnostique service d'immuno-rhumatologie. *Etudes approfondies des polyarthrites et maladies systémiques* : 30.
- Benly P.** (2015). Role of histamine in acute inflammation. *Journal of Pharmaceutical. Sciences and Research*. 7 (6): 373–378.
- Bensalem S, Soubhye J, Aldib I, Bournine L, Nguyen AT, Vanhaeverbeek M, Rousseau A, Boudjeltia KZ, Sarakbi A, Kauffmann JM, Nève Jj, Prévost M, Stévigny C, Maiza-Benabdesselam F, Bedjou F, Antwerpen PV, Duez P.** (2014). Inhibition of myeloperoxidase activity by the alkaloids of *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 154(2): 361-369
- Bensimon G, Berlin I, Hulot JS, Lacomblez L, Lebrun-Vignes B, Lechat P. and Warot D.** (2006). Pharmacologie. Paris : Lechat. : 349.
- Berger MM.** (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20: 48-53.

- Bergstra SA. and Allaart CF.** (2018). What is the optimal target for treat-to-target strategies in rheumatoid arthritis?. *Current Opinion in Rheumatology*: 1.
- Berrougui H, Isabelle M, Cloutier M, Hmamouchi M and Khalil A.** (2006). Protective effects of *Peganum harmala* L. Extract, harmine and harmaline against human low-density lipoprotein oxidation. *Pharmacy and Pharmacology*. 58: 967-974.
- Bessis D.** (2007). Manifestations des connectivites, vasculites et affections systémiques apparentées. *Ed: Springer*: 13-14.
- Bhat SV, Nagasampagi BA, Sivakumar M.** (2005). Chemistry of Natural Products. Narosa, New Delhi, India.Ch. 4: 237.
- Bhatia SS and Majka DS.** (2007). Rheumatoid factor seropositivity is inversely associated with oral contraceptive use in women without rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 66(2): 267-269.
- Bohui PSG, Adima AA, Niamké FB, N'Guessan JD.** (2018). Etude comparative de trois méthodes d'extraction des flavonoïdes totaux à partir des feuilles de plantes médicinales : *Azadirachta indica* et *Psidium guajava*. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*. 46 : 50 – 58.
- Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanach N, Géraldine F.** (2012). Rheumatoid arthritis: From autoimmunity to synovitis and joint destruction. *Journal of Autoimmunity*. 39: 222-228.
- Bouziane N.** (2012). Toxicité comparée des extraits d'Euphorbia guyoniana Boiss. & Reut. (Euphorbiaceae) et de *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) récoltés au Sahara Septentrional Est algérien sur les larves et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). Thèse Magister en Sciences Agronomiques. Ouregla : 72.
- Bozec A, Luo Y, Engdahl C, Figueiredo CP, Bang H, Schett G.** (2018). Abatacept blocks anti-citrullinated protein antibody and rheumatoid factor mediated cytokine production in human macrophages in IDO-dependent manner. *Arthritis Research & Therapy*. 20(24): 2-9.
- Briellmann HL, Setzer WN, Kaufman PB, Kirakosyan A, Cseke LJ.** (2006). Phytochemicals: The Chemical Components of Plants. In: Natural Products from Plants. 2nd ed. *CRC Tylor & Francis* (Boca Raton, Florida): 1-49.
- Brown P, Pratt A. & Isaacs J.** (2016). Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nature Reviews Rheumatology*. 12: 731–742.
- Bruinvels J et Sourkes T.L.** (1968). Influence on Drugs on the temperature lowering effect of harmaline. *European Journal of Pharmacology*. 4 (1): 31-39.
- Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, Sharma P, Lowe GDO, World MJ, Humphries SE and Hingorani AD.** (2003). Human CRP Gene Polymorphism Influences CRP Levels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 23(11): 2063-2069.
- Brune K and Patrignani P.** (2015). New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Journal of Pain Research*. 8: 105–118.
- Burits M and Bucar F.** (2000). Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy Research*. 14: 323-328.
- Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisenant KD & Guma M.** (2017). Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. BioMed Central. 19(1): 110.

- Caron JL and Allan Petterson.** (2007). Dessin, douleur et musique : la vie et l'œuvre : 179- 180.
- Cerhan JR, Saag KG, Merlino LA, Mikuls TR, Criswell LA.** (2003). Antioxidant micronutrients and risk of rheumatoid arthritis in a cohort of older women. *American Journal of Epidemiology*. 157: 345-54
- Champy V, Mitrovic D, Collin P, Lomri A.** (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du Rhumatisme*. 74: 636-643.
- Charpin C.** (2011). Nouveaux auto-anticorps dans la polyarthrite rhumatoïde. Thèse de Doctorat en Immunologie. Faculté des sciences de luminy, Université Aix-Marseille II. Marseille, France.
- Chen H, Chao R, Hou X, Yan H, Zhou S, Peng W. and Xu A.** (2005). Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *International Journal of Cancer*. 114(5): 675-682.
- Christine B and Oehler R.** (2020). The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Brostjan and Oehler Cell Death Discovery*. 6: 26.
- Chrubasik S, Thanner J, Kunzel O, Conradt C, Black A & Pollak S.** (2002). Comparison of outcome measures during treatment with the proprietary Harpagophytum extract doloteffin in patients with pain in the lower back, knee or hip. *Phytomedicine*. 9(3): 181.
- Cimino F, Speciale A, Siracusa L, Naccari C, Saija A, Mancari F, Raciti R, Cristani M, Trombetta D.** (2014). Cytotoxic effects induced in vitro by organic extracts from urban air particulate matter in human leukocytes. *Drug and Chemical Toxicology*. 37(1): 32-39.
- Claiborne A.** (1986). Catalase activity. In: Greenwald, R.A. (Ed.), *CRC handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, Boca Raton, FL: 283–284.
- Clavel.** (2004). La polyarthrite rhumatoïde où est-on ? *Assiphar. Bulletin* n° 15.
- Claverie I. and Hedde H.** (2008). *Pharmacologie générale, mécanisme fondamentaux*. Porphyre : 48-61.
- Combe B.** (2007). Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte. Aspects cliniques. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale Masson, Paris*. 14: 220-A-10.
- CRI : Club Rhumatismes et Inflammation.** <http://www.cri-net.com/> (Le 20/06/2012).
- Cuendet M, Hostettmann K, Dyatmiko W, Potterat O.** (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*. 80(4): 1144–1152.
- Cuzzocrea S, Reiter RJ.** (2001). Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *European Journal of Pharmacology*. 426(1–2): 1-10.
- Dabravolski SA, Orekhova VA, Baig MS, Bezsonov EE, Starodubova AV, Popkova TV, and Orekhov AN.** (2021). The Role of Mitochondrial Mutations and Chronic Inflammation in Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*. 22: 6733.
- Dai J, and Mumper RJ.** (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15(10): 7313-7352.
- Dall'Acqua S.** (2014). Natural Products As Antimitotic Agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 14(20): 2272-2285(14).
- Damiano J et Bardin T.** (2004). Liquide synovial normal et pathologique. *EMC Rhumatologie Orthopédie*. 1: 2-16.

- Dapkevicius A, Venskutonis R, Van Beek TA, Linszen JPH.** (1998). Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 77(1): 140-146.
- Dashti S.** (2020). Antiviral Properties of *Peganum harmala* (Espand) as a Medicinal Plant: A Literature Review. *Herbal Medicines Journal*. 5(3): 127-128.
- De S, Das D. and Mandal T.** (2016). *In vitro* anti-inflammatory and anti-diabetic activity of methanolic extract of *Cardanthera difformis* druce. *International Research Journal of Pharmacy*. 7(12): 56-60.
- Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM.** (2017). Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 31: 3–18.
- Decker EA, Welch B.** (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 674-677.
- Dejean and Richard.** (2013). Mécanismes d'action des glucocorticoïdes. *La Revue de Médecine Interne*. Elsevier Masson. 34(5) : 264–268.
- Delay L.** (2018). La douleur chronique articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde : rôle des canaux ASIC3 dans l'arthralgie induite par les ACPA et des voies de signalisation NGF/TrkA dans la douleur chronique inflammatoire. Ecole doctorale des sciences de la vie, sante, agronomie & environnement. Thèse Présentée à l'Université Clermont Auvergne Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université. 32-65.
- DeVita Jr VT and Chu E.** (2008). A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Research*. 68 (21): 8643–8653.
- Diafat A.** (2014). Evaluation des effets anti-arthritique et toxique de l'extrait méthanolique de l'*Ajuga iva*. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences. Université Ferhat Abbas-Setif, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 1-160.
- Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM, Stocker P.** (2010). RETRACTED: Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*. 48(10): 2599-2606.
- Djidel S, Khenouf S, Ameni D, Baghiani A, Arrar L, Charef N.** (2013). Antioxidant proprieties of *Pistacia lentiscus* L. Leaves extracts. *Pharmacognosy Communication*. 3: 28-34.
- Dorward DA, Lucas CD, Rossi AG, Haslett C, Dhaliwal K.** (2012). Imaging inflammation: Molecular strategies to visualize key components of the inflammatory cascade, from initiation to resolution. *Pharmacology & Therapeutics*. 135: 182-199.
- Doskaliyev A, Seidakhmetova RB, Tutai DS, Goldaeva K, Surov VK, Adekenov SM.** (2021). Alkaloids of *Peganum harmala* L. and their Pharmacological Activity. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 08. 9(A): 766-775.
- Dougados M, Kahan A, Revel M, et al.** (2005). Polyarthrite rhumatoïde en 100 questions. NHA communication, Paris, 2005.
- Draper HH, and Hardley M.** (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 186: 421–431.

- Duke AJ.** (2002). Handbook of Medicinal Plants. 2nd ed. *CRC Press* (Boca Raton, Florida): 717.
- Dumontet E, and Bigot-Corbel E.** (2012). Physiopathologie de l'atteinte osseuse et articulaire dans la polyarthrite rhumatoïde. *Elsevier Masson SAS*. 446: 65-72.
- Elansary HO, Szopa A, Kubica P, Ekiert H, Al-Mana FA and El-Shafei AA.** (2020). Polyphenols of *Frangula alnus* and *Peganum harmala* Leaves and Associated Biological Activities. *Plants*. 9: 1086.
- El-Gazzar M, El Mezayen R, Marecki JC, Nicolls MR, Canastar A, Dreskin SC.** (2006). Anti-inflammatory effect of thymoquinone in mouse model of allergic lung inflammation. *International immunopharmacology*. 6(7) : 1135-1142.
- Ellithey MS, Lall N, Hussein AA, Meyer D.** (2014). Cytotoxic and HIV-1 enzyme inhibitory activities of Red Sea marine organisms. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14: 1-8.
- Ellman GL.** (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 82(1): 70-77.
- Essakalli M, Atouf O, Bennani N, Benseffaj N, Ouadghiri S, Brick C.** (2008). Toll Like receptor. *Pathol Biol* doi:10.1016/j.patbio..04.003.
- Essakallia M, Benseffaja N, Atoufa O, Bricka C.** (2011). La polyarthrite rhumatoïde : un vieux système dans un nouveau concept. *Revue Francophone Des Laboratoires*. 436 : 51- 58.
- Eyquem A, Alouf J, Montagnier L.** (2000). Traité de microbiologie clinique : deuxième mises à jour et compléments. *Ed: Piccin Nouva Libreria S.P.A*: 110.
- Fang YZ, Yang S, & Wu G.** (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 18(10): 872-879.
- Farouk L, Laroubi A, Aboufatima R, Benharref A, and Chait A.** (2008). Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: Possible mechanisms involved. *Journal of Ethnopharmacology*. 115: 449–454.
- Fidelis QC, Faraone I, Russo D, Aragão Catunda-Jr FE, Vignola L, de Carvalho MG, Tommasi N & Milella L.** (2019). Chemical and Biological insights of *Ouratea hexasperma* (A. St.-Hil.) Baill: A source of bioactive compounds with multifunctional properties. *Natural product research*. 33(10): 1500-1503.
- Finaud J, Lac G, Filaire E.** (2006). Oxidative Stress. Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine*. 36(4): 327-358.
- Finckh A.** (2014). Facteurs de risque pour le développement d'une polyarthrite rhumatoïde. *Rev Med Suisse*. 10: 581-584.
- Firestein GS.** (2008). Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. **In:** Firestein G S, Budd R C, Harris E D, McInnes I B, Ruddy S and Sargent J S. Kelley's textbook of rheumatology (volume II), 8th ed. Philadelphia: Elsevier: 1035-1085.
- Firestein GS. and McInnes IB.** (2017). Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*. 46(2): 183–196.
- Forman HJ, Augusto O, Brigelius-Flohe R, Dennery PA, Kalyanaraman B, Ischiropoulos H, Mann GE, Radi R, Roberts LJ, Vina J, Davies KJA.** (2015). Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radical Biology and Medicine*. 78 : 233-235.
- Frankel EN and, Meyer AS.** (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 1925-1940.

- Frisell T, Holmqvist M, Kallberg H, Klareskog L, Alfredsson L, Askling J.** (2013). Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: Role of rheumatoid factor/anti-citrullinated protein antibody status, number and type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis Rheumatism*. 65(11): 2773-2782.
- Frison G, Favretto D, Zancanaro F, Fazzin G & Ferrara SD.** (2008). A case of β - carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic Science International*. 179 (2-3): e37-e43.
- Georgé S, Brat P, Alter P, & Amiot JM.** (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1370-1373.
- Gerhard W.** (2014). La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte : stratégies thérapeutiques et concept du patient-expert. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de pharmacie, Université de Lorraine. Nancy, France.
- Ghizlane EA, Merbouh M, Haddad Arhoun I, Diyas S, Lezreg M, Bkiyar H, Housni B.** (2021). Fatal poisoning of pregnant women by *Peganum harmala* L.: A case reports. *Annals of Medicine and Surgery*. 68: 102649.
- Gholivand MB, Rahimi-Nasrabadi M, Batooli H, Ebrahimabadi AH.** (2010). Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton Canescens*. *Food chemical toxicology*. 48: 24-28.
- González D, Ancín-Azpilicueta C, Arán VJ, Guillén H.** (2010). Bêta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*. 48 (3): 839-845.
- Goodla L, Manubolu M, Pathakoti K, Jayakumar T, Sheu JR, Fraker M, Tchounwou PB and Poondamalli PR. Poondamalli PR.** (2019). Protective effects of ammannia baccifera against CCl4-induced oxidative stress in rats. *International journal of environmental research and public health*. 16(8): 1440.
- Gseyra N.** (2006). Etude phytochimique de deux espèces pastorales : *Artemisia herba alba* Asso. Et *Peganum harmala* L. et l'évolution de la toxicité de *Peganum harmala* pendant son cycle phénologique. Université Mohamed Premier, Faculté des sciences Oujda. 122-124.
- Guemmaz T, Zerargui F, Boumerfeg S, Arrar L, Aouachria S, Khennouf S, Charef N & Baghiani A.** (2018). Anti-hemolytic, Anti-lipid Peroxidation, Antioxidant Properties and Acute Toxicity of Xanthium strumarium Leaves Extracts. *Annual Research & Review in Biology*: 1-12.
- Guergour H, Allouni R, Mahdeb N, Bouzidi A.** (2017). Acute and subacute toxicity evaluation of alkaloids of *Peganum harmala* L. in experimental mice. *International. Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 9: 1182–1189.
- Guillemin F, Saraux A, Guggenbuhl P, Roux CH, Fardellone P, Le Bihan E.** (2005). Prevalence of rheumatoid arthritis in France: 2001. *Annals of Rheumatic Diseases*. 64: 1427-1430.
- Hamdi O, Zarrouk Z, Jemmali S, Bousaid S, Rekik S, Sahli H, Elleuch M.** (2021). Utilisation des anti-inflammatoires non stéroïdiens en pratique quotidienne. *Revue du Rhumatisme*. 88(1): A189-A190
- Hammaker DR, Boyle DL, Inoue T, Firestein GS.** (2007). Regulation of the JNK pathway by TGF-beta activated kinase 1 in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Research & Therapy*. 9(3) : 57.
- Hammiche V, Merad R, Azzouz M.** (2013). Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. Springer-Verlag France, Paris.

- Hamsa TP, Kuttan G.** (2010). Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both *in vivo* and *in vitro*. *European Journal of Pharmacology*. 649 (1-3): 64–73.
- Hanser C.** (2009). Les compléments alimentaires à visée anti-arthrosique chez le cheval. Thèse de Doctorat. Faculté de pharmacie, Université Henri Poincare, Nancy 1, France : 1-156.
- Haroon E, Welle JR, Woolwine BJ, Goldsmith DR, Baer W, Patel T, Felger JC, and Miller AH.** (2020). Associations among peripheral and central kynurenine pathway metabolites and inflammation in depression. *Neuro-psychopharmacology*. 45: 998 – 1007.
- Helmes RA, Quan DJ, Herfindal ET, Gourley DR.** (2006). Textbook of therapeutics: drug and disease management. Ed: Lippincott: 1705.
- Herraiz T, González D, Ancin-Azpilicueta C, Arán VJ & Guillén H.** (2010). β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*. 48 (3): 839-845.
- Herz B, Albrecht A, Englbrecht M, Welsch GH, Uder M, Renner N, Schlechtweg P, Paul D, Lauer L, Engelke K, Janka R, Rech J, Schett G, Finzel S.** (2014). Osteitis and synovitis, but not bone erosion, is associated with proteoglycan loss and microstructure damage in the cartilage of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 73(6): 1101–1106.
- Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E.** (2003). The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *Journal Immunol*. 171: 538–541.
- Hodge HC and Sterner JH.** (1992). Determination of substances acute toxicity by LD50B. *American Industrial Hygiene Association*. 1943. (10): 93. In: Lu EC. Toxicologie (traduit de l'anglais par Lhuguenot JC et Riviere JL). Masson, Paris.
- Hodge HC and Sterner JH.** (1949). Tabulation of Toxicity Class. *American Industrial Hygiene Association Quarterly*. 10(4): 93-96.
- Hodgson E & Cunny H.** (2010). Toxicity Testing. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4th ed. John Wiley & Sons. Inc (Hoboken, New Jersey): 409-456.
- Hu Y, Chi, L, Kuebler WM, and Goldenberg NM.** (2020). Perivascular Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Cells*. 9: 2338.
- Hughes GC. and Choubey D.** (2014). Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone. *Nature Reviews Rheumatology*. 10(12): 740–751.
- Huyut Z, Beydemir G, & Gülçin Ğ.** (2017). Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. *Biochemistry Research International*: 35-45.
- Ighodaro OM, & Akinloye OA.** (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*. 54(4): 287-293.
- Imboden JB.** (2009). The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *The Annual Review of Pathology*. 4: 417-434.

- Iqbal Z, Javed M, Rafique G, Saleem T.** (2019). A comparative study of total phenolic contents and antioxidant potential of seeds of *Peganum harmala*. *International Journal of Biosciences*. 14 (3): 121-127.
- Ishida S, Yamane S, Nakano S, Yanagimoto T, Hanamoto Y, MaedaTanimura M, Toyosaki-Maeda T, Ishizaki J, Matsuo Y, Fukui N, Itoh T, Ochi T, Suzuki R.** (2009). The interaction of monocytes with rheumatoid synovial cells is a key step in LIGHT-mediated inflammatory bone destruction. *Immunology*. 128(1pt2): 315-324.
- IUCN.** (2005). A guide to medicinal plant in North Africa. Publié par *International Union for Conservation of Nature and Natural resources*: 133.
- Jalali A, Dabaghian F, and Zarshenas MM.** (2021). Alkaloids of *Peganum harmala*: Anticancer Biomarkers with Promising Outcomes. *Current Pharmaceutical Design*. 27 (2): 185-196 (12).
- Janssens G.** (2006). Répertoire d'analyses de biologie Clinique. Institut de biologie clinique : 1-257.
- Jodynys-Liebert J, Nowicki M, Murias M, Adamska T, Ewertowska M, Kujawska M, Piotrowska H, Konwerska A, Ostalska-Nowicka D, & Pernak J.** (2010). Cytotoxicity, acute and subchronic toxicity of ionic liquid, didecyldimethylammonium saccharinate, in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 57: 266-273.
- Jordan SA, Cunningham DG, Marles RJ.** (2010). Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 243(2): 198-216.
- Kanathip S, Pimchanok C, Waritsara C, Nirut B, Pitsinee F, and Karitta C.** (2020). Antilipoxygenase and Anti-Inflammatory Activities of *Streblus asper* Leaf Extract on Xylene-Induced Ear Edema in Mice. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*. 3176391: 5.
- Kanso F, Khalil A, Noureddine H, El-Makhour Y.** (2021). Therapeutic perspective of thiosemicarbazones derivatives in inflammatory pathologies: A summary of *in vitro/in vivo* studies. *International Immunopharmacology*. 96 (2021). 107778: 1-14.
- Kaskoos RA.** (2014). Physico-chemical parameters, phytochemical screening and antioxidant activity of seeds of *Peganum harmala* collected from Iraq. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 4(28): 20-24.
- Katz IH, Nagar EE, Okun Z and Shpigelman A.** (2020). The Link between Polyphenol Structure, Antioxidant Capacity and Shelf-Life Stability in the Presence of Fructose and Ascorbic Acid. *Molecules*. 25(1): 225.
- Keating GM.** (2013). Abatacept: A Review of its Use in the Management of Rheumatoid Arthritis. *Drugs*. 73(10): 1095–1119.
- Kebbi R, Besseboua O, Nait-Mouloud M, Ayad A.** (2020). *In-vitro* acaricidal activity of *Peganum harmala* and *Glaucium flavum* alkaloid against *Rhipicephalus sp.* of dog. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*. 36(1): 28-35.
- Khaldoon M. Alawneh, Wafa Y. Madanat, Diala Alawneh, Mahmoud S. Smadi.** (2020). Prevalence of rheumatoid arthritis among hospital workers in the north of Jordan: Preliminary report of a hospital-based cohort study. *Annals of Medicine and Surgery*. 60: 579-582.
- Khelifi D, Sghaier RM, Amouri S, Laouini D, Hamdi M, Bouajila J.** (2013). Phytochemical screening, total phenolics and biological activities of Tunisian *Peganum harmala* seed extracts. *Food and Chemical Toxicology*. 55: 202-208.

- Kivrak EG, Yurt KK, Kaplan AA, Alkan I, & Altun G.** (2017). Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *Journal of microscopy and ultrastructure.* 5(4): 167-176.
- Koller A.** (1984). Total serum protein. In: Kaplan LA, Presce AJ, eds. *Clinical Chemistry, Theory, Analysis, and Correlation.* 5th ed, St. Louis: Mosby Company: 1316-1319.
- Komeili G, Hashemi M, and Bameri-Niafar M.** (2016). Evaluation of Antidiabetic and Antihyperlipidemic Effects of *Peganum harmala* Seeds in Diabetic Rats. *Hindawi Publishing Corporation.* 2016. 7389864: 6.
- Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S, Vladimir-Knezevic S.** (2004). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica.* 54: 65 – 72.
- Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, El Hamidi M, Tligui N, Lyoussi B, Hassar M.** (2002). Experimental toxicity of *Peganum harmala* seeds. *Annales Pharmaceutiques Francaises.* 60: 123–129.
- Lamchouri F, Settaf A, Cherrah Y, Hasser M, Zemzami M, Arif N, Nadori EB, Zaid A, Lyoussi B.** (2000). *In vitro* cell toxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell lines. *Fitoterapia.* 71: 50-54.
- Lapointe G.** (2004). Notions de Toxicologie. 2nd ed. *Commission de la santé et de la sécurité du travail* (Québec, Canada) : 16-20.
- Lars-Olof H, Current H.** (1997). Qualitative determination of C-reactive protein (CRP) *Opinion in infection diseases* 10: 196-201.
- Le K, Chiu F, & Ng K.** (2007). Identification and quantification of antioxidants in Fructus lycii. *Food Chemistry.* 105(1) : 353-363.
- Lebham.** (2005). Mémoire du Laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) - Université de Bretagne Occidentale (UBO): 65.
- LeBlanc GA.** (2010). Acute toxicity. In: A Textbook of Modern Toxicology. 4th Ed *John Wiley & Sons.* Inc (Hoboken, New Jersey): 125-236.
- Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux C, Kahan A, Ekindjian OG, Borderie D.** (2006). Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. *Clinica Chimica Acta.* 372: 147-153.
- Lessing PH, Delmenico S.** (2007). Une vitesse de sédimentation augmentée. *Forum Med Suisse.* 7: 765–769.
- Lewis ME.** (2004). Endocranial lesions in non-adult skeletons: understanding their aetiology. *International Journal of Osteoarchaeology.* 14(2): 82-97
- Li YK.** (2005). Study on the chemical constituents of above ground of *Peganum harmala* L. Master Dissertation. Northwest Agriculture Forestry University, Shanxi.
- Li HB, Cheng KW, Wong CC, Fan KW, Chen F, & Jiang Y.** (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry.* 102(3): 771-776.
- Li S, Cheng X, Wang C.** (2017). A review on traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and toxicology of the genus *Peganum*. *Journal of Ethnopharmacology.* 203: 127–162.
- Lin YJ, Anzaghe M, and Schülk S.** (2020). Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells.* 9(4): 880.
- Ling SF, Viatte S, Lunt M, Van Sijl AM, Silva-Fernandez L, Symmons DPM, Young A, Macgregor AJ, Barton A.** (2016). HLA-DRB1 Amino Acid Positions 11/13, 71, and 74 Are Associated With Inflammation Level, Disease Activity, and the Health Assessment Questionnaire Score in Patients with Inflammatory Polyarthritis. *Arthritis & Rheumatology.* 68(11): 2618–2628.

- Littlejohn EA, Monrad S.** (2018). Early Diagnosis and Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 45: 237–255.
- Locatelli M, Travaglia F, Coisson JD, Martelli A, Stevigny C, & Arlorio M.** (2010). Total antioxidant activity of hazelnut skin (*Nocciola Piemonte* PGI): Impact of different roasting conditions. *Food Chemistry*. 119: 1647-1655.
- Luo Y, Wei Z, Chou G, Wang Z, Xia Y, Dai Y.** (2014). Norisoboldine induces apoptosis of fibroblast-like synoviocytes from adjuvant-induced arthritis rats. *International Immunopharmacology*. 20(1) : 110-116.
- Ma ZZ, Hano Y, Qiu F.** (2007). Triterpenoids from *Peganum nigellastrum*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 9 (6): 575-578.
- Mahdeb N, Sahnoune M, Bouzidi A.** (2013). Etude épidémiologique des cas d'intoxications aiguës traitées l'hôpital de Sétif entre janvier 2008 et avril 2012 (Est-Algérie). *European Scientific Journal*. 9: 157-165.
- Mahmoudian M, Jalilpour H. et Salehian PS.** (2002). Toxicity of *Peganum harmala*: Review and a Case Report. *Iranian journal of pharmacology & therapeutics*. 1 (1): 1-4.
- Majid A.** (2018). A review study of the chemical constituents and therapeutic effects of *Peganum harmala* L. *Global Journal of Pure and Applied Chemistry Research*. 6(2): 12-19.
- Malecky M.** (2005). Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement. *Agro Paris Tech*. 9 : 13-19 and 20-27.
- Mamedov NA, Pasdaran A, Mamadalieva NZ.** (2018). Pharmacological studies of Syrian rue (*Peganum harmala* L., Zygophyllaceae). *International journal of secondary metabolite*. 5(1): 1–6.
- Marc B.** (2012). La polyarthrite rhumatoïde de l'adulte, place et rôle du pharmacien d'officine dans sa prise en charge et la délivrance des biothérapies à l'officine. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. U.F.R de Médecine et de Pharmacie de Rouen, France : 86-111.
- Markham KR.** (1982). Chapter.1 and 2. Techniques of flavonoid identification. Academic press, (London): 1-113.
- Mars B.** (2009). The Desktop Guide to Herbal Medicine. Publisher ReadHowYouWant: 492.
- Martey ON, Armah G, Okine LKN.** (2010). Absence of organ specific toxicity rats treated with Tonica, an aqueous herbal haematonic preparation. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 7(3): 231–240.
- Marzouk I.** (2021). Activité antioxydante, métabolisme des composants polyphénoliques et méthodes d'étude de l'activité antioxydante. THÈSE Pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie. Royaume du Maroc université Mohammed V de Rabat. Faculté de médecine et de pharmacie, Rabat: 47.
- Mbiantcha M, Kamanyi A, Teponno RB, Taponjoui LA, Watcho P, & Nguelfack TB.** (2011). Analgesic and Anti-inflammatory Properties of Extracts from the Bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. *Var sativa*. (Dioscoreaceae) in Mice and Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*: 1-9.
- Medjeldi S, Bouslama L, Benabdallah A, Essid R, Haou S, Elkahoui S.** (2018). Biological activities, and phytochemicals of northwest Algeria *Ajuga iva* (L) extracts: Partial identification of the antibacterial fraction. *Microbial Pathogenesis*. 121: 173-178.
- Mégarbane B, Alazia M, Baud F.** (2006). Intoxication grave de l'adulte: épidémiologie, définition, critères d'admission en réanimation Severe poisoning in adults: epidemiology, definition, and criteria of admission in intensive care units. *Réanimation*. 15(5): 354-363.

- Melloul S, Zehioua R, Meniai AH.** (2022). Supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from local *Peganum harmala* plant seeds and optimization of the extraction yield and the antioxidant activities. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 28 : 100729.
- Mihara M, Ohsugi Y, Kishimoto T.** (2011). Tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, for treatment of rheumatoid arthritis. *Open Access Rheumatology: Research and Reviews*. 3: 19–29.
- Mikuls TR, Payne JB, Deane KD, Thiele GM.** (2016). Autoimmunity of the lung and oral mucosa in a multisystem inflammatory disease: The spark that lights the fire in rheumatoid arthritis?. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 137(1): 28–34.
- Milane H.** (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg.
- Minichiello E, Semerano L. and Boissier MC.** (2017). Incidence, prévalence et sévérité de la polyarthrite rhumatoïde au XXI^e siècle. *Revue du Rhumatisme Monographies*. Elsevier Masson. 84(4) : 303–310.
- Moghadam MS, Maleki S, Darabpour E, Motamedi H & Seyyed Nejad SM.** (2010). Antibacterial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 3 (4): 262-265.
- Monsef HR, Ghobadi A, Iranshahi M & Abdollahi M.** (2004). Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. alkaloid extract on mouse formalin test. *Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Science*. 7: 65-69.
- Morel J, Miossec P, Combe B.** (2004). Immunopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *EMC-Rhumatologie Orthopédie*. 1: 218–230
- Mosmann T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55–63.
- Moussaid M, Elamrani AE, Bourhim N, Benaissa M.** (2011). *In vivo* anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant activities of Moroccan medicinal plants. *Natural Product Communications*. 6: 1441–1443.
- Moyo B, Oyedemi S, Masika PJ, & Muchenje V.** (2012). Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. *Meat science*. 91(4): 441-447.
- Mukinda JT and Eagles PFK.** (2010). Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 128: 236–240.
- Murugan R. and Parimelazhagan T.** (2014). Comparative evaluation of different extraction methods for antioxidant and anti-inflammatory properties from *Osbeckia parvifolia* Arn. – An *in vitro* approach. *Journal of King Sud University - Science*. 26(4): 267-275.
- Mythilypriya R, Shanthy P, Sachdanandam P.** (2008). Therapeutic effect of Kalpaamruthaa, a herbal preparation on adjuvant induced arthritis in Wistar rats. *Inflammopharmacology*. 16: 21–35.
- Niroumand MC, Farzaei MH, Amin G.** (2015). Medicinal properties of *Peganum harmala* L. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy: A review. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 35(1): 104-109.
- Nizard R.** (2005). Principes de la chirurgie dans la polyarthrite rhumatoïde. *La revue du praticien*. (55) : 2158-2159.
- Ogeturk M, Kus I, Colakoglu N, Zararsiz I, Ilhan N, & Sarsilmaz M.** (2005). Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 97(2): 273- 280.

- Okhawa H, Ohishi N, Yagi K.** (1979). Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric reaction. *Analytical Biochemistry*. 95: 351–358.
- Okoli CO, Akah, PA, Nwafor SV, Anisiobi AI, Ibegunam IN, Erojikwe O.** (2007). Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia Africana* C.D. Adams. *Journal of Ethnopharmacology*. 109(2) : 219-225.
- Oliveira GK, Tormin TF, Sousa RM, de Oliveira A, de Morais SA, Richter EM, & Munoz RA.** (2016). Batch-injection analysis with amperometric detection of the DPPH radical for evaluation of antioxidant capacity. *Food chemistry*. 192: 691-697.
- Ollier WER.** (2001). What is the natural history of rheumatoid arthritis?. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology*. 15(1): 27-48.
- Østensen M and Villiger P M.** (2002). Immunology of pregnancy as a remission-inducing agent in rheumatoid arthritis. *Transplant Immunology*. 9: 155-160.
- Ouzid Y, Smail-Saadoun N, Houali K.** (2019). Antimitotic and antiproliferative activities of crude fungal extracts of endophytic foliar fungi of *Peganum harmala* l. From dayate aiat (Laghouat, Algeria). *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. 11(2): 587-604.
- Oyaizu M.** (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44: 307-315.
- Ozanda P.** (1991). Flore et végétation du Sahara, 3^{ème} édition, Ed CNRS, Paris.: 662 In mémoire de master Université des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.
- Ozanda P.** (1977). Flore du Sahara, Ed du CNRS : 312-322 In mémoire de magister Université des Sciences de la Nature et de la Vie -Ferhat Abbes-Sétif, 2012.
- Park MH, Kim DH, Lee EK, Kim ND, Im DS, Lee J, Lee J, Yu BP & Chung HY.** (2014). Age-related inflammation and insulin resistance: a review of their intricate interdependency. *Archives of pharmacal research*. 37(12): 1507-1514.
- Patel SS. and Shah PV.** (2013). Evaluation of anti-inflammatory potential of the multidrug herbomineral formulation in male Wistar rats against rheumatoid arthritis. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. 4(2): 86-93.
- Perricone C, Ceccarelli F and Valesini G.** (2011). An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: A never-ending story. *Autoimmunity Reviews*. 10: 599-608.
- Pillon F, Michiels Y.** (2013). Épidémiologie et physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. *Actualités Pharmaceutiques*. 52(531, Supplement): 1-2.
- Pierre M, Oya M, Madeleine Obouo VM, Ehoulé K, et Sébastien Djédjé D.** (2017). Étude des toxicités aigüe et subaigüe du remède nature utilise dans le traitement du paludisme. *Revue Ivoirienne des Sciences et Technologie*. 29 : 145 – 158.
- Pincus T and Cutolo M.** (2015). Clinical trials documenting the efficacy of low dose glucocorticoids in rheumatoid arthritis. *Neuro-immunomodulation*. 22: 46–50.
- Polzer K, Baeten D, Soleiman A, Distler J, Gerlag DM, Tak PP, Schett G, Zwerina J.** (2008). Tumour necrosis factor blockade increases lymphangiogenesis in murine and human arthritic joints. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 67(11): 1610.

- Pradeep K, Mohan CVR, Gobianand K, & Karthikeyan S.** (2007). Effect of *Cassia fistula* Linn. Leaf extract on diethylnitrosamine induced hepatic injury in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 167(1): 12- 18.
- Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A, Dammacco F, Perosa F.** (2011). Extraarticular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. *Autoimmunity Reviews*. 11: 123-131.
- Prieto P, Pineda M, & Aguilar M.** (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*. 269(2): 337-341.
- Quevauvilliers J et al.** (2009). Dictionnaire médical. 6ème édition. Paris : Elsevier Masson SAS: 1533.
- Quzel P et Santa S.** (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du Centre national de la recherche scientifique (CNRS). Tome II. Paris.
- Rahman MM, Rahaman MS, Islam MR, Rahman F, Mithi FM, Alqahtani T, Almikhlaifi MA, Alghamdi SQ, Alruwaili AS, Hossain MS et al.** (2022). Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules*. 27: 233.
- Ramadan G and El-Menshawey O.** (2013). Protective effects of ginger turmeric rhizomes mixture on joint inflammation, atherogenesis, kidney dysfunction and other complications in a rat model of human rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases*. 16(2): 219–229.
- Rasekh HR, Yazdanpanah H, Hosseinzadeh L, Bazmohammadi N, Kamalinejad M.** (2010). Acute and Subchronic Toxicity of Teucrium polium Total Extract in Rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 4(4): 245-249.
- Rathinam VA, & Fitzgerald KA.** (2016). Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. *Cell*. 165(4): 792-800.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26 (9-10): 1231–1237.
- Reddy UA, Prabhakar PV, & Mahboob M.** (2017). Biomarkers of oxidative stress for *in vivo* assessment of toxicological effects of iron oxide nanoparticles. *Saudi journal of biological sciences*. 24(6): 1172-1180.
- Reichl FX.** (2004). Guide pratique de toxicologie. 2nd ed. DeBoeck & Larcier (Bruxelles): 4-16.
- Rezaei M, Nasri S, Roughani M, Niknami Z and Ziai SA.** (2016). *Peganum harmala* L. Extract Reduces Oxidative Stress and Improves Symptoms in 6 Hydroxydopamine-Induced Parkinson's disease in Rats. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 15(1): 275-281.
- Rezzagui A, Merghem M, Derafa I, Dahamna S.** (2020). Acute and Sub-acute Toxic Effects of Algerian *Peganum harmala* L. Crud Extract. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 10(2): 115-121.
- Righi N, Boumerfeg S, Fernandes PA, Deghima A, Baali F, Coelho E, Cardoso SM, Coimbra MA & Baghiani A.** (2020). *Thymus algeriensis* Bioass & Reut: Relationship of phenolic compounds composition with *in vitro/in vivo* antioxidant and antibacterial activity. *Food Research International*. 136: 109500.
- Rivera A, Chen CC, Ron N, Dougherty JP, Ron Y.** (2001). Role of B cells as antigenpresenting cells in vivo revised antigen-specific B cells are essential for cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentration. *International Immunology*. 13: 1583-1593.
- Rkain M, El Kettani S, Rhalem N.** (2011). Profil épidémiologique des incidents et intoxications aiguës accidentelles chez l'enfant. *Espérance médicale*. 18: 532-535.

- Rokni N, Faridnia R, Esboei BR, Eslami S, Fakhar M, Youssefi MR, Kalani H, Keighobadi M.** (2021). *Peganum harmala* and *Nigella sativa*: anti-leishmanial activity against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes: *in vitro* and *ex vivo* experiment. *Annals of Parasitology*. 67(2): 313–319.
- Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE.** (2003). Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*. 48: 601-606.
- Roxanna PG, Eguileta Rodriguez AL, Ramos-Martinez I, Zuñiga NM, Gonzalez-Salinas R, Quiroz-Mercado H, Zenteno E, Hernández ER, and Hernández-Zimbrón LF.** (2020). Interplay between Oxidative Stress, Inflammation, and Amyloidosis in the Anterior Segment of the Eye. *Its Pathological Implications*. 2020. Article ID 6286105: 14.
- Saber T, Veale DJ, Balogh E, McCormick J, NicAnUltaigh S, Connolly M, Fearon U.** (2011). Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the Tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. 6(8): 23540.
- Sadasivam S, Thayumanavan B.** (2003). Molecular host plant resistance to pests. Books in soils, plants and the environment. *CRC Press*: 221.
- Saeedeh F, Oryan S, Ahmadi R, Eidi A.** (2022). Evaluation of chemical components, anti-oxidant properties, and lethal toxicity of alkaloids extracted from espond (*Peganum harmala*). *Journal of Applied Biological Sciences*. 16(2): 257-265.
- Sahreen S, Khan MR. and Khan RA.** (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food chemistry*. 122(4): 1205-1211.
- Saleem MI, Mahfooz SA, Ashraf MM, Jafar MM and Ashar A.** (2020). Evaluation of anti-protozoal activity of *Peganum harmala* (harmal) against babesiosis in cattle. *Pakistan Journal of Agriculture Agricultural Engineering and Veterinary Sciences*. 36(1): 55-60.
- Sánchez-Moreno C.** (2002). Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*: 8(3).
- Sany J.** (2003). Polyarthrite rhumatoïde de l'adulte: conception actuelle. *Ed: John Libbey Eurotext. Montrouge*: 6-100-113-178-298.
- Saravanan V. and Kelly CA.** (2004). Reducing the risk of methotrexate pneumonitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 43 : 143–147.
- Sardella A.** (2010). Rôle des lysophospholipides dans la physiopathologie de la polyarthrite rhumatoïde. Thèse de Doctorat en pharmacie, Québec. Canada.
- Sebbag M, Chapuy-Regaud S, Auger I, Petit-Teixeira E, Clavel C, Nogueira L, et al.** (2004). Intérêt clinique et rôle physiopathologique de la réponse auto-immune contre les protéines citrullinées dans la polyarthrite rhumatoïde. *Revue du Rhumatisme*. 71: 872-882.
- Senhaji S, Lamchouri F, Boulfia M, Lachkar N, Bouabid K, Toufik H.** (2022). Mineral composition, content of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of aqueous and organic extracts of the seeds of *Peganum harmala* L. *South African Journal of Botany*. 147: 697-712.
- Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW.** (2010). Fundamentals of inflammation. *Hardback, USA*: 13-14.

- Serhan CN, Gupta NS, Perretti M, Godson C, Brennan B, Li E, Soehnlein O, Shimizu T, Werz O, Chiurchiù V, Azzi A, Dubourdeau M, Gupta SS, Schopohl P, Hoch M, Gjorgevikj D, Khan FM, Brauer D, Wolkenhauer O.** (2020). The Atlas of Inflammation Resolution (AIR). *Molecular Aspects of Medicine*. 74: 100894.
- SFR: Société Française de Rhumatologie.** (2006). Dossier Polyarthrite rhumatoïde.
- Shabani SHS, Tehrani SSH, Rabiei Z, Enferadi ST, Vannozi GP.** (2015). *Peganum harmala* L.'s anti-growth effect on a breast cancer cell line. *Biotechnology Reports*. 8: 138-143.
- Shaheen HA, Issa MY.** (2020). *In vitro* and *in vivo* activity of *Peganum harmala* L. alkaloids against phytopathogenic bacteria. *Scientia Horticulturae*. 264: 108940
- Shahrajabian MH, Sun W and Cheng Q.** (2021). Improving health benefits with considering traditional and modern health benefits of *Peganum harmala*. *Clinical Phytoscience*. 7: 18.
- Sharaf M, El-ansari MA, Stephen AM, Nabel AMS.** (1997). Four flavonoid glycosides from *Peganum harmala*. *Phytochemistry*. 44(3): 533-536.
- Sharma AD, Inderjeet K, Narveer S.** (2021). Tryptophan fluorescence spectroscopy: key tool to study protein denaturation/anti-inflammatory assay. *Research & Reviews in Biotechnology & Biosciences*. 8(1): 90-94.
- Sharma S, Pathak N. and Chattopadhyay K.** (2012). Osmolyte induced stabilization of protein molecules: a brief review. *Journal of proteins and proteomics*. 3(2): 129- 139.
- Shatarat A, Abuhamdah S, Al-Essa M, Mohammed F, Al-Olimat S.** (2014). Pharmacological effects of *Peganum harmala* L. root extract on isolated rat small intestine. *Pharmacognosy Communications*. 4(3): 56–61.
- Shi J, Van de Stadt LA, Nivine Levarht EW, Huizinga TWJ, Toes REM, Trouw LA, Schaardenburg DV.** (2013). Anti-Carbamylated Protein Antibodies Are Present in Arthralgia Patients and Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 65(4): 911–915
- Shirani-Boroujeni M, Heidari-Soureshjani S, Hafshejani K.** (2017). Impact of oral capsule of *Peganum harmala* L. on alleviating urinary symptoms in men with benign prostatic hyperplasia; a randomized clinical trial. *Journal of Renal Injury Prevention*. 6(2): 127–131.
- Side Larbi K.** (2016). Potentiel du contenu Polyphénolique et Huiles Essentielles de Quelques Plantes Médicinales à Activités Anticartilagineuse et Biologiques. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Biologiques. Université Mustapha Stambouli de MASCARA : 1-201.
- Silman A, Kay A, Brennan P.** (1992). Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 35(2): 152–155.
- Singh AB, Chaturvedi JP, Narender T, Srivastava K.** (2008). Preliminary studies on the hypoglycemic effect of *Peganum harmala* L. seeds ethanol extract on normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 23(4): 391–393.
- Singhai A & Patil UK.** (2021). Amelioration of oxidative and inflammatory changes by *Peganum harmala* seeds in experimental arthritis. *Clinical Phytoscience*: 7(13).
- Slimani S, and Ladjouze-Rezig A.** (2014). Prevalence of rheumatoid arthritis in an urban population of Algeria: a prospective study. *Rheumatology (Oxford)*. 53(3): 571-573.
- Smirnoff N.** (2018). Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*. 122: 116-129.

- Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, et al.** (2008). Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Lancet*. 371: 987–97.
- Smolen JS, Landewé R, Bbijlsma J, Burmester G, Chatzidionysio K et al.** (2017). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Annals of the rheumatic diseases*. 76(6): 960–977.
- Spel L, Martinon F.** (2020). Inflammasomes contributing to inflammation in arthritis. *Immunological Reviews*. 00: 1–15.
- Stamp LK, James MJ, Cleland LG.** (2005). Diet and rheumatoid arthritis: a review of the literature. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 35: 77-94.
- Sturgeon A, Finan PH & Zautra AJ.** (2016). Affective disturbance in rheumatoid arthritis: psychological and disease-related pathways. *Nature Reviews Rheumatology*. 12: 532–542.
- Szekanecz Z, Besenyi T, Paragh G, Koch AE.** (2009). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. 42: 563–573.
- Tahri N, Rhalem N, Soulaymani A.** (2004). L'intoxication au Harmel, *Peganum harmala* L. *Esperance. Med*. 101: 5-7.
- Tahrouch S, Rapior S, Mondolot-Cosson L, Idrissi-Hassani LA, Bessière JM et Andary C.** (2002). *Peganum harmala* : Source combinée d'arômes ET de colorants. *Reviews in Biology and Biotechnology*. 2 (2): 33-37.
- Tanase C, Coşarcă S, & Muntean DL.** (2019). A critical review of phenolic compounds extracted from the bark of woody vascular plants and their potential biological activity. *Molecules*. 24(6): 1182.
- Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB.** (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7(3): 1089-1099.
- Tavakolpour S, AleSaeidi S, Darvishi M, Ghasemiadl M, Darabi-Monadi S, Akhlaghdoust M, Behjati SE, Jafarieh A.** (2019). A comprehensive review of rituximab therapy in rheumatoid arthritis patients. *Clinical Rheumatology*. 38: 2977–2994.
- Tobón GJ, Youinou P and Saraux A.** (2010). The environment, geo epidemiology, and autoimmunity disease: Rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*. 35: 10-14.
- Topçu G, Mehmet A, Bilici A, Sarıkürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A.** (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103(3): 816-822.
- Toussiro E and Roudier J.** (2007). Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein Barr virus: An update. *Joint Bone Spine*. 74: 418-426.
- Tran CN, Lundy S, Fox DA.** (2005). Synovial biology and T cells in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 12: 183-189.
- Tuncer T, Gilgil E, Kaçar C, Kurtals Y et al.** (2018). Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis in Turkey: a nationwide study *Archives of Rheumatology*. 33(2): 128–136.
- Vaillancourt F, Silva P, Shi Q, Fahmi H, Fernandes JC, Benderdour M.** (2011). Elucidation of molecular mechanisms underlying the protective effects of thymoquinone against rheumatoid arthritis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 112(1): 107-117.
- Viatte S, Plant D, Rraychaudhuri S.** (2013). Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 9(3): 141-153

- Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF.** (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition reviews*. 68: 280-289.
- Wang C, Zhang Z, Wang Y, He X.** (2015). Cytotoxic Indole Alkaloids against Human Leukemia Cell Lines from the Toxic Plant *Peganum harmala*. *Toxins*. 7: 4507-4518.
- Wang Y, Wang H, Zhang L, Zhang Y, Deng G, Li S, Cao N, Guan H, Cheng X, Wang C.** (2020). Potential mechanisms of tremor tolerance induced in rats by the repeated administration of total alkaloid extracts from the seeds of *Peganum harmala* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 262.
- Weyand CM. and Goronzy JJ.** (2017). Immunometabolism in early and late stages of rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology*. 13(5): 291–301.
- WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New Millennium.** (2003). ‘The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. *World Health Organization technical report series*. 919: p. i–x, 1-218.
- Williams LAD, Connar AO, Latore L, Denis O, Ringer S , Whittaker JA, Conrad J, Vogler B, Rosner H, Kraus W.** (2008). The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and nonsteroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Medical Journal*. 57(4): 327-331.
- Yeom MJ, Lee HC, Kim GH, Lee HJ, Shim I, Oh SK, Kang S, Hahm DH.** (2006). Anti-arthritic effects of Ephedra sinica STAPF herb-acupuncture: inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation and adjuvant-induced polyarthritis. *Journal of Pharmacological Sciences*. 100: 41-50.
- Zainab GK, Hafeez A, Ihsan UI, Tofeeq UR, Syed AM, Shazadi I, Nighat F, Nisar UR.** (2016). Antioxidant, Antimicrobial and Antileishmanial Study of different parts of *Peganum harmala*. *International Journal of Biosciences*. 9 (1): 45-58.
- Zhang Q, Yan-Hui Z, Han-Gao Y, Meng-Yue Y, Fang-Shen L, Sheng-Ge L, Xiao-Hui P, Bin L, Zhan-Lin L, Da-Hong L, Hui-Ming H.** (2022). Anti-tumor alkaloids from *Peganum harmala*. *Phytochemistry*. 197: 113107.
- Zhang QW, Lin LG, & Ye WC.** (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese medicine*. 13(1): 20.
- Zhang Y, Shi X, Xie X, Vaughn Laster K, Pang M, Liu K, Hwang J, Joon Kim D.** (2021). Harmaline isolated from *Peganum harmala* suppresses growth of esophageal squamous cell carcinoma through targeting Mtor. *Phytotherapy Research*. 35(11): 6377-6388.
- Zhang X, Zhang D, Jia H, Feng Q, Wang D, et al.** (2015). The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature Medicine*. 21(8): 895–905.
- Zimmer AR, Leonardi B, Mirona D, Schapovalva E, Rodrigues de Oliveirac J, Gosmanna G.** (2012). Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology*. 139: 228–233.
- Zrouer SH, Boumiza R, Sakly N, Mannai R, Korbaa W, Younes M, Bejia I, Touzi M and Bergaoui N.** (2010). The impact of pregnancy on rheumatoid arthritis outcome: The role of maternofetal HLA class II disparity. *Joint Bone Spine*. 77: 36-40.

Annexe

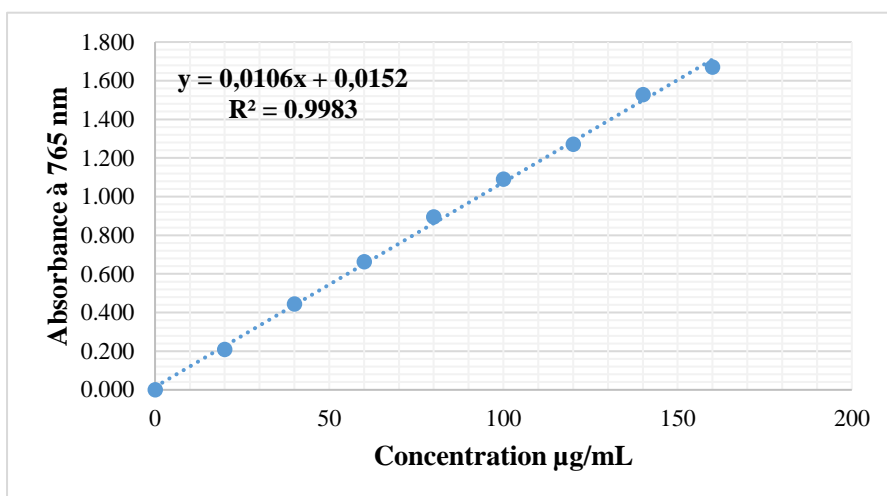


Figure 1. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

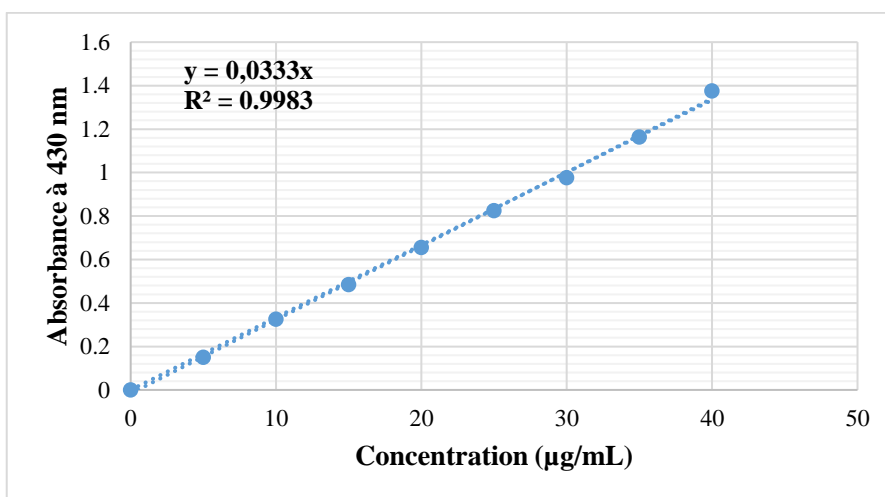


Figure 2. Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

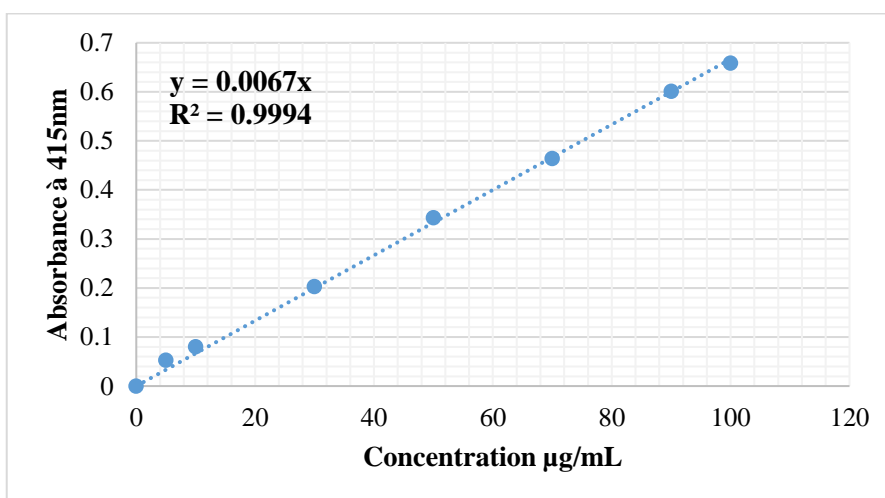


Figure 3. Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

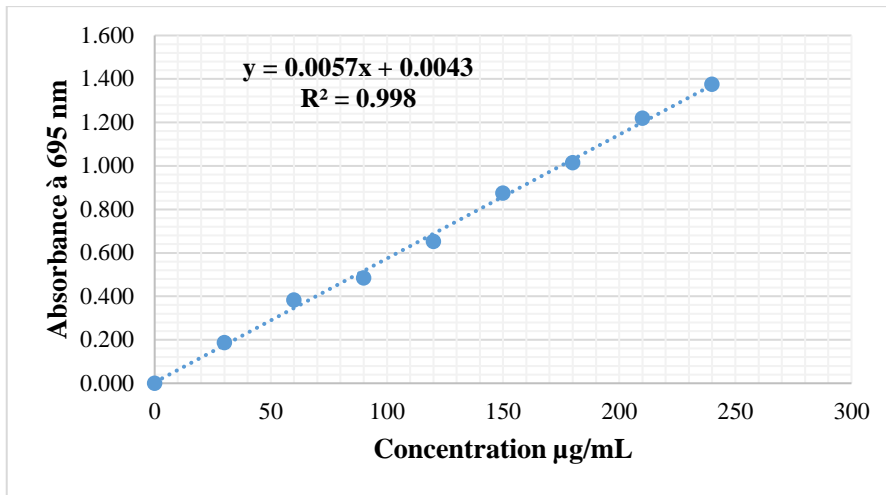


Figure 4. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

CYTOTOXIC, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF *Peganum harmala* L. EXTRACTS

Dehiri Mounira¹

Diafat Abdelouahab¹

Fatmi Widad²

Ben Mansour Riadh³

Bouaziz Farid¹

Bahloul Ahmed²

¹Laboratory of Characterization and Valorization of Natural Products, Faculty of Nature and Life Sciences, University El-Bachir El-Ibrahimi, Bord jBou Arreridj

²Laboratory of Health and Environment, Faculty of Nature and Life Sciences, University El-Bachir El-Ibrahimi, Bord jBou Arreridj

³Laboratory Analysis, Valuation of Food Securities, Biotechnology Research Group and Pathologies, National School of Engineering of Sfax (ENIS), Tunisia

E-mail: abdelouahab.diafat@univ-bba.dz

Received 12.11.2021

Revised 20.01.2022

Accepted 28.02.2022

Peganum harmala L., known as 'Harmel', is a plant widely used in the traditional Algerian medicine.

Aim. The purpose of this work is to study the antioxidant, antiproliferative and antimicrobial potential of *Peganum harmala* extracts.

Methods. Colorimetric methods were used to quantify phenolic compounds, while the antioxidant activity was estimated *in vitro* using DPPH/ABTS radical scavenging assay, ferric reducing power, β -carotene bleaching assay, total antioxidant capacity, and ferrous iron chelating assay. The agar well diffusion and the broth microdilution method were used to evaluate the antibacterial activity and the MTT assay was used to test the cytotoxicity of the extracts.

Results. The ethanolic extracts of *Peganum harmala* L. showed the highest polyphenols content and

Toxicity evaluation of Algerian *Peganum harmala* seed hydromethanolic extract

Mounira Dehiri¹ · Abdelouahab Diafat¹ · Widad Fatmi² · Farid Bouaziz¹ · Rebai Khali

Accepted: 21 August 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Korean Society of Environmental Risk Assessment and Health Sci

Abstract

Objective *Peganum harmala* L. is a plant widely used in the traditional Algerian medicine. The objective of this study was to assess the safety profile of *P. harmala* hydromethanolic extract (PhHm).

Methods In the acute toxicity, the animals were divided into six groups, and the extract doses of 70, 200, 300, 500, 800 or 2000 mg/kg Body weight. The general behavior of mice was monitored every day for 14 days. In the Chronic toxicity the animals were divided into 4 groups for 90 days. Groups 1, 2 and 3: received the extract with a dose of 100, 200 and 300 mg/kg each month blood samples were taken for biochemical and hematological tests.

Results In the acute toxicity, mortality is dose dependent, where the median lethal dose (LD₅₀) was 1000 mg/kg Body weight. In the chronic toxicity, the extract did not cause any behavioral changes; significant increase in liver enzymes were observed while urea and creatinine levels decreased. Repeated oral administration of PhHm extract, an increase in platelet numbers was noted. The histopathology of the liver showed a leukocyte infiltration and a vascular congestion.

Conclusion Based on the results of this study, it can be suggested that the PhHm seed extract is safe for oral administration.